

**EINHEILUNG UND PHARMAKOKINETIK EINER
GENTAMICIN – TRICALCIUMPHOSPHAT – KOMBINATION
AM FEMUR DER RATTEN**

PANAGIOTA PAPADOPOULO

1986

Aus der Klinik und Poliklinik für Zahn-, Mund-
und Kieferchirurgie der Universität München

Vorstand: Prof. Dr. Dr. D. Schlegel

EINHEILUNG UND PHARMAKOKINETIK EINER
GENTAMICIN - TRICALCIUMPHOSPHAT - KOMBINATION
AM FEMUR DER RATTEN

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Zahnheilkunde
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Panagiota Papadopoulou

aus

Artopoula - Ioannina
Griechenland

Jahr

1986

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Priv.Doiz.Dr.Dr. J. Randzio

Mitberichterstatter: 1. Prof.Dr.Dr. D. Schlegel
2. Prof.Dr. F. Miller

Dekan: Prof.Dr. W. Spann

Tag der mündlichen

Prüfung: 18.10.1986

Meinen Eltern
gewidmet.

Danksagung

Herrn Prof. Dr. Dr. D. Schlegel danke ich herzlich für die Überlassung des Dissertationsthemas und seine freundliche Unterstützung bei der Bereitstellung der histologischen Untersuchungsmöglichkeiten.

Besonders bei Herrn Dr. Dr. J. Randzio möchte ich mich für die Betreuung und Beratung bei der Abfassung der Arbeit sehr herzlich bedanken.

Herrn Prof. Dr. K. Thoma (Vorstand des Instituts für Pharmazie und Lebensmittelchemie der Ludwig-Maximilians-Universität München) und Herrn Apotheker R. Alex bin ich für ihre Hilfe bei der Durchführung der Tierversuche zu Dank verpflichtet.

Bei Herrn Dr. med. vet. Richter bedanke ich mich ebenfalls für seinen Beitrag zur Durchführung der Tierexperimente.

Außerdem schulde ich Dank dem Verein zur Förderung der wissenschaftlichen Zahnheilkunde in Bayern e.V., der durch seine finanzielle Förderung es ermöglicht hat, daß im klinikeigenen Histologielabor die erforderliche technische Einrichtung angeschafft werden konnte.

Ebenfalls bedanke ich mich bei Dr. Guy Briche für seine Unterstützung.

Mein besonderer Dank richtet sich an meine Freunde Luigi, Donna Carla und Don Uwe für ihren in asketischer Demut und Bescheidenheit erbrachten Beitrag zur Anfertigung meiner Arbeit.

Inhaltsverzeichnis	Seite
1. Einleitung	3
2. Allgemeiner Teil	4
2.1 Das Knochengewebe	4
2.1.1 Die organische Interzellulärsubstanz	
2.1.2 Die Zellen	
2.1.3 Die mineralische Knochensubstanz	
2.2 Osteomyelitis	8
2.2.1 Therapie	
2.2.2 Neue Verfahren der lokalantibiotischen Behandlung	
2.3 Gentamicin	14
2.3.1 Struktur und biochemische Eigenschaften	
2.3.2 Gentamicin als Wirkstoff eines Drug – Depots	
2.4 Tricalziumphosphat (TCP)	17
2.4.1 Biologische, chemische und physikalische Eigenschaften	
2.4.2 Klinische Anwendung	
3. Tierexperimenteller Teil	25
3.1 Fragestellung der vorliegenden Untersuchung	25
3.2 Material und Methode	25
3.2.1 Herstellung der Implantate	
3.2.1.1 Herstellung der keramischen Matrices	
3.2.1.2 Beladung mit Wirkstoff	
3.2.2 Versuchsdurchführung	
3.2.2.1 Operationstechnik	
3.2.2.2 Untersuchungstechnik	

	Seite
4. Ergebnisse der eigenen Tierversuche	33
4.1 Postoperativer Verlauf	33
4.2 Ergebnis der Freisetzungsprüfung von Gentamicin	34
4.3 Röntgenologische Ergebnisse	34
4.4 Histologische Untersuchungen der Lymphknoten	38
4.5 Histologische Untersuchungen der Milz	38
4.6 Histologische, licht- und fluoreszenz- mikroskopische Untersuchungen der Femora	41
4.7 Mikroradiographie	66
5. Untersuchungen mit dem Rasterelektronenmikroskop	69
5.1 Untersuchungstechnik und Untersuchungsmaterial	69
5.2 Untersuchungsergebnisse mit dem REM	70
6. Diskussion	76
7. Zusammenfassung	86
8. Literaturverzeichnis	87

1. Einleitung

Die posttraumatische Osteomyelitis ist eine entzündliche Erkrankung des Knochengewebes, wobei die Keimsiedlung des Knochens im Gegensatz zur hämatogenen Osteomyelitis in den meisten Fällen auf direktem Wege durch traumatisches oder operatives Freilegen des Knochens zustande kommt. Sie stellt trotz aller therapeutischen Fortschritte der letzten Jahre, insbesondere wegen ihrer Rezidivgefahr, eines der schwerwiegendsten unfallchirurgischen Krankheitsbilder dar. Trotz verbesserter Asepsis und Operationstechnik muß heute nach Osteosynthesen geschlossener Frakturen mit einer Infektionsrate von 0,5 - 1,7 % gerechnet werden. Nach offenen Frakturen ist die Infektionsgefahr erheblich höher. In einer Sammelstatistik wird von Infektraten zwischen 2,7 - 43% ausgegangen. (BURRI 1974)

Während für die Behandlung der hämatogenen Osteomyelitis eine systemische Antibiose nötig ist, sind für die Behandlung der posttraumatischen Osteomyelitis die Erhaltung der Stabilität, die Ausräumung infizierter und nekrotischer Gewebe, die Spül-Saugdrainage und die Auffüllung des Defektes mit autologer Spongiosa wesentliche Maßnahmen. Anstelle der Spül-Saugdrainage unter Verwendung von Ringer-Laktat-Lösung mit oder ohne Antibiotikazusatz hat die Implantation von Gentamicin-Polymethacrylsäuremethylester-Kugeln in die revidierte Knochenhöhle eine erhebliche Verbesserung in der Therapie der Osteomyelitis bewirkt. (BURRI 1974, BURRI, RÜTER 1979, KLEMM 1976)

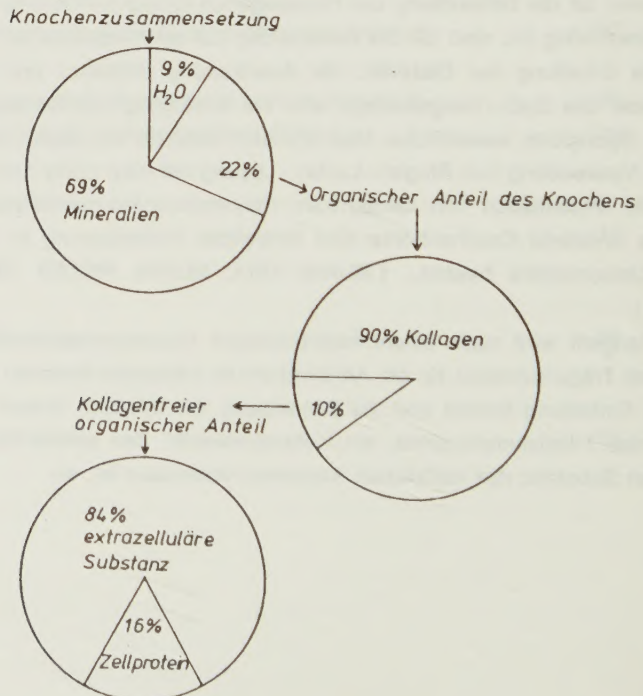
Seit langem wird nach einem resorbierbaren Knochenersatzmaterial gesucht, das als Trägersubstanz für ein Antibiotikum im infizierten Knochen zur problemlosen Einheilung kommt und die Beseitigung der Infektion fördert. Hier bietet sich das Tricalciumphosphat, ein Keramikmaterial, das bereits in der mineralischen Substanz des natürlichen Knochens vorhanden ist, an.

2. Allgemeiner Teil

2.1. Das Knochengewebe

Chemisch – physikalisch betrachtet enthält der Knochen eine Matrix und Mineralien. Die Matrix selbst besteht aus Zellen und der Interzellulärsubstanz, wobei man Grundsubstanz, Fasern, interstitielle Flüssigkeit und freie Elektrolyte unterscheidet. Die Zusammensetzung des Knochens kann schematisch so dargestellt werden:

Tab. 1 Zusammensetzung des Knochens (nach Triffitt 1972)



2.1.1. Die organische Interzellulärsubstanz

Die organische Interzellulärsubstanz wird unter anderem aus Fasern und Mukopolysacchariden gebildet. Die Fasern sind überwiegend Kollagenfasern. Jedes Kollagenmolekül enthält drei Polypeptidketten, die in einer Triple-Helix angeordnet sind. Jede Kette besteht aus Aminosäuren (23 – 29 % Glyzin, 15 – 18 % Prolin, 11 – 14 % Hydroxylprolin) und 1 % Kohlehydraten. (KLUG et al, 1985, KNESE 1980)

Während aller Entwicklungsstadien sind die osteogenen Stammzellen fähig, Interzellulärsubstanz zu bilden, wobei die Osteoblasten überwiegen. (KLUG et al, 1985)

Die nichtkollagenen Komponenten sind Sialoproteine, Phosphoproteine, die eine selektive Affinität zu Kalzium aufweisen, Proteine, die γ -Kaboxiglutaminsäure enthalten, Plasmaproteine wie Plasmaalbumin, γ -Globulin, α -Glycoprotein sowie in kleineren Mengen Peptide und Lipide (Triglycerid).

Nach Trifft beginnt die Mineralisation in einer Matrix, die anfänglich 30 – 50 % kollagenfreie Substanz enthält.

2.1.2. Die Zellen

Knochenaufbau, Knochenresorption und Stoffwechsel des Knochengewebes sind die Funktionen von Osteozyten, Osteoblasten und Osteoklasten.

Osteoblasten

Osteoblasten bilden den größten Teil der Matrix. Sie befinden sich reichlich in der Kambiumschicht des Periostes und im Endost. Sie sind rund, pyramidal oder kuboidal geformt und weisen ein basophiles Zytoplasma auf.

Die Osteoblasten ordnen sich in Abhängigkeit zur Anordnung der Kollagenfibrillen der benachbarten Matrix an. Sie besitzen Rezeptoren für Parathormon und 1,2,5-Dihydroxyl-Cholecalciferol, wodurch ihre Haftung an der Matrix wohl gesteuert wird. (JONES et al, 1985)

Osteoblasten können auf der Knochenoberfläche wandern, ohne ihre Teilungs-

fähigkeit einzubüßen. Sie bewegen sich, wie man in Zellkulturen beobachtet hat, mit ungefähr $10 \mu\text{m/h}$ und können auch auf rauen Oberflächen wandern. Die Formation der Matrix beginnt erst dann, wenn die Osteoblasten in einer kontinuierlichen Reihe angeordnet sind. (JONES et al, 1985)
Ihre Knochenbildungsrate beträgt ca. $1 - 2 \mu\text{m/Tag}$. Ultrastrukturell fallen an Osteoblasten zahlreiche Mitochondrien auf, von denen manche feine Granulate aus Kalziumphosphat und Spuren von Magnesium enthalten.
REYNOLDS (1983) schreibt den Osteoblasten auch eine resorptive Rolle zu aufgrund der Sekretion von Kollagenasen oder anderer Proteinasen. (Zitat von JONES et al, 1985)

Osteozyten

Während der Knochenbildung mauern sich die Osteoblasten im Knochen ein und verwandeln sich in Osteozyten. Sie liegen in Lakunen und senden feine Zellvorsätze in die Canaliculi des Knochens aus. Osteozyten sind fähig, Zitate, Lactate, Collagenase und lysosomale Enzyme zu bilden, was die Resorption des Knochens um den Osteozyten fördert. (JONES et al, 1985, MATTHEWS 1972)

Osteozyten sind an der Oberfläche unmittelbar von einer Polysaccharidschicht umgeben, die die Zellen von der Lakunenwand trennt.

Junge, frisch eingeschlossene Osteozyten reagieren basophil nur wenig schwächer als Osteoblasten. Ihre Zahl pro Quadratmillimeter Schnittfläche nimmt beim Menschen im Laufe des Lebens von etwa 1150 auf 750 ab. (KNESE 1962)

Der Tod der Osteozyten ist mit dem des Knochens identisch. (FROST 1960, zitiert n. KNESE 1980)

Osteoklasten

Es handelt sich um Riesenzellen mit bis zu 100 Zellkernen und einer großen Zahl von Mitochondrien. Aktive Osteoklasten resorbieren sowohl die organische als auch die mineralische Substanz des Knochens. (JONES et al, 1985,

MATTHEWS 1972)

Sie lösen das Knochenmaterial durch Sekretion von H^+ - Ionen auf. Dabei sinkt der pH-Wert von 7,4 bis auf ca. 6,9 ab. Bei der Demineralisation können die Protonen folgende Reaktionen mit dem Hartgewebe eingehen (DULCE 1980):



Die Auflösung der organischen Substanz geschieht in Abhängigkeit vom pH-Wert durch die von den Osteoklasten gebildete Kollagenase und Proteinase.

Die Osteoklasten werden durch Parathormon, Vitamin D3 und Prostaglandin aktiviert. Ihre Lebensdauer beträgt 2 - 3 Tage. (BEDACHT 1969)

2.1.3. Die mineralische Knochensubstanz

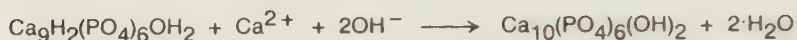
Das Knochenskelett stellt einen Ionenpool mit einer Austauschfläche von 100 m^2/g Mineral und einem Mineralgehalt von 1200 - 1300 mg/cm^3 bei Männern und 1100 - 1200 mg/cm^3 bei Frauen dar. (HEUCK 1980)

Der anorganische Teil des Knochens besteht aus Phosphaten, Karbonaten und Zitraten. Der Hauptbestandteil ist Hydroxylapatit (HA) mit der Summenformel $Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$. 60 % davon liegen in kristaliner Phase und 40 % in mikrokristaliner amorpher Phase vor. (KLUG et al, 1985, DULCE 1980)

Der jugendliche, frisch gebildete Knochen weist ein hexagonales Kristallgitter des Oktacalciumphosphats ($Ca_8H_2(PO_4)_6 + 5 \cdot H_2O$) auf.

Das primäre Mineralisationsprodukt bei der Knochenbildung ist ein amorphes,

röntgenanalytisch nicht differenzierbares Calciumphosphat. Es wird Defektopatit genannt und besitzt die Summenformel $\text{Ca}_9\text{H}_2(\text{PO}_4)_6\text{OH}_2$. Sein Ca/P - Verhältnis beträgt 1:48; durch Aufnahme weiterer Calciumionen entsteht daraus HA nach folgender Reaktion:



Die Apatitkristallnadeln liegen in der Längsachse der Kollagenfibrillen und umgeben sie mit 5 - 10 Schichten. Sie weisen eine Länge von 2 - 4 μm und eine Dicke von 0.25 - 0,40 μm auf. (KLUG et al, 1985, KNESE 1980)

2.2. Osteomyelitis

Bei der Osteomyelitis oder Ostitis unterscheidet man u.a. 2 Formen:

- a) endogene oder hämatogene Osteomyelitis, die durch hämatogene Streuung von Eitererregern hervorgerufen wird.
- b) exogene oder posttraumatische Osteomyelitis, wobei die Keimsiedlung des Knochens in den meisten Fällen auf direktem Wege durch traumatische oder operative Freilegung des Knochens zustande kommt.

Die akute hämatogene Osteomyelitis wird in 80 - 95 % der Fälle durch *Staphylokokkus aureus*, in 10 % der Fälle durch *Streptokokken* hervorgerufen. Bei der posttraumatischen Osteomyelitis sind (nach DINGELDEIN 1979) *Staphylokokkus aureus* mit 43 % und gramnegative Bakterien mit 41 % beteiligt. ADERHOLT, 1985, kam nach bakteriologischen Analysen der Osteomyelitis im Kieferbereich zu anderen Ergebnissen. s. Tab 2.

In den letzten Jahren nehmen die gramnegativen Problemkeime, wie *Pseudomonas*, *Proteus*, *E.coli*, und *Klebsiella* zu.

Tabelle 2. Bakteriologischer Befund und Sensibilität gegen Gentamicin

Stämme		Σ	s	ms	r
Aerobier					
Gram +	Staphylococcus aureus	12	12		
	Staphylococcus epidermidis	3	2	1	
	Streptococcus viridans	8		7	1
	Streptococcus faecalis	1			1
	Enterokokken	2		2	
	Neisserien	3	2	1	
Gram -					
	Escherichia coli	3	3		
	Pseudomonas aeruginosa	3	3		
	Proteus mirabilis	1	1		
	Klebsiella sp.	1	1		
Anaerobier					
Gram +	Peptococcus magnus	1			1
	Peptostreptococcus anaerobius	1		1	
Gram -	Bacteroides melaninogenicus	4		2	2
	Fusobacterium nucleatum	2			2
Sterile Kultur: 4		Σ	45	24	14
Keine bakt. Unters.: 1					
Mono : Mischinfektion 19 10					
(s = sensibel, ms = mäßig sensibel, r = resistent)					

2.2.1. Therapie

Die hämatogene Osteomyelitis wird durch die systemische Antibiose behandelt. Bei der chronischen posttraumatischen Osteomyelitis ist eine systemische antibiotische Therapie wegen der schlechten Durchblutung des osteomyelitischen Herdes und der dadurch limitierten Wirksamkeit des Antibiotikums nicht von Bedeutung. Die Standardtherapie der posttraumatischen Osteomyelitis besteht aus folgenden Maßnahmen:

1. Ausräumung der Knochendefekte mit der Entfernung von Fremdmaterial, Sequester, avitalem Knochen und Weichteilgewebe.
2. Stabilisierung, wodurch der Infektionsherd ruhiggestellt wird.
3. Spül-Saugdrainage, die sowohl der mechanischen Ausschwemmung von Detritussekret, Blut und Bakterien als auch der lokalen antibakteriellen Behand-

lung dient (z.B. Ringer - Lösung mit Polybactrin). (BURRI 1974)

Eine Alternative zur antibakteriellen Spül - Saugdrainage bietet die Implantation von Gentamicin - Polymethylmethacrylat - Kugeln (Gentamicin - PMMA - Kugeln, Septopal^R). (KLEMM 1976 u. 1980, SCHULTE und BURRI 1979, ADERHOLT 1985)

Im Gegensatz zur antibakteriellen Spül - Saugdrainage ist es mittels Gentamicin - PMMA - Kugeln gelungen, eine sehr hoch dosierte, lokalantibiotische Behandlung mit kontinuierlicher Einwirkung des Antibiotikums über Wochen und Monate hinweg nach einmaliger Applikation durchzuführen. (WAHLING, 1972)

4. Auffüllung eines ossären Defektes durch frische autologe Spongiosa

2.2.2. Neue Verfahren der lokalantibiotischen Behandlung

Obwohl die Gentamicin - Kugeln bei der Ostitistherapie eine deutliche Verbesserung der Heilungsrate (KLEMM 1976, ADDICKS et al, 1984, ADERHOLD 1985, KIRCH 1985, RANDZIO 1985), d.h. der Infektberuhigung erbracht haben, wohnen dieser Behandlungsmethode noch gewisse Nachteile inne. Die Entfernung der Kugeln, insbesondere wenn sie längerfristig belassen werden, erfordert oftmals einen Eingriff in der Allgemeinanästhesie; die neuerliche Eröffnung des Knochens birgt die Gefahr einer Reinfektion. Bei ausgedehnten Knochenhöhlen stellt die Notwendigkeit den Defekt mit autologer Spogiosa aufzufüllen, eine weitere Belastung des Patienten dar.

Seit langem wird an der Entwicklung von resorbierbaren Knochenersatzmaterialien gearbeitet, die in Kombination mit einem Breitspektrumantibiotikum zur Behandlung oder zur Prophylaxe von Knocheninfektionen verwendet werden können. (Tab. 3)

Tab. 3 Tierversuche mit Antibiotika-Träger-Substanzen

Autor/Jahr	Trägersubstanz	Medikament	Indikation
Schultheis 1981	Prolamin	Gentamycin	experimentelle Osteomyelitis bei Kaninchen
Götz 1981	Kollagen	Taurolin 4%	experimentelle Osteomyelitis bei Hunden
Stemberger 1983	Kollagen	Gentamycin	experimentelle Osteomyelitis bei Kaninchen
Eitenmüller 1983	TCP-Granulat	a) PVP Jod b) Flucloxacillin c) Fosfomycin	experimentelle Osteomyelitis bei Hunden
Petri 1984	demineralisierter, gefriergetrockneter Knochen mit Gelatine	Cephalothin Tobramycin	experimentelle Osteomyelitis bei Hunden
Randzio 1985	TCP-Zylinder	Gentamycin	im Kiefer bei Ratten

SCHULTEIS et al (1981, 1983) führten Experimente mit Kaninchen durch. Als Trägerstoff verwendeten sie Prolamin (Ethibloc^R) mit Gentamicin im Verhältnis 5ml Prolamin/135 mg Gentamicin sowie im Verhältnis 1ml/180mg. Prolamin wird durch Makrophagen abgebaut. Das abdiffundierende Gentamicin erreicht am Implantationsort während der ersten 5 Tage p.o. einen therapeutischen Wirkspiegel.

GÖTZ et al. (1981) setzten zur Therapie einer experimentellen Osteomyelitis an Kaninchen Taurolin 4 % - Gel-Stäbchen ein. Bei dem Chemotherapeutikum Taurolin handelt es sich um Bis(1.1 - dioxo - perhydro - 1,2,4 - thiadiazinyl - 4) - Methan. (PFIRRMANN 1983)

Die Osteomyelitis wurde dadurch unter Kontrolle gebracht. BURRI und LOB (1982) haben die Osteomyelitis bei 40 Patienten ebenfalls mit Taurolin behandelt, wobei eine primäre Heilung der Operationswunde bei 30 Patienten festgestellt wurde. In zwei Fällen erforderte die Situation eine offene Wundbehandlung, in 8 Fällen war eine nochmalige Revision notwendig.

STEMBERGER et al (1983) verwendeten eine Mischung von 1 - 2 g Gentamicin/cm³ Kollagen (Genta-Koll^R) zur Implantation in infizierten Femora von Kaninchen. In der Kompakta und dem Knochenmark war Gentamicin bis zum 28. Tag nachweisbar. Die Werte betrugen 8 mg Gentamicin/g Kompakta. Bei 15 Tieren waren die Keimabstriche ab der 2. Woche negativ, nur bei einem positiv.

EITENMÜLLER et al. (1983) implantierten nach Infektion mit Staphylokokkus aureus in den Knochen von Bastardhunden eine Mischung aus:

Tricalciumphosphat - Granulat und PVP - Jod

Tricalciumphosphat - Granulat und Flucloxacillin

Tricalciumphosphat - Granulat und Fosfomicin

Die Tiere, die mit Flucloxacillin - TCP - Granulat behandelt worden waren, zeigten nach 4 Wochen keinerlei Entzündungserscheinungen mehr.

PETRI (1984) implantierte nach experimenteller Osteomyelitis in der Ulna von

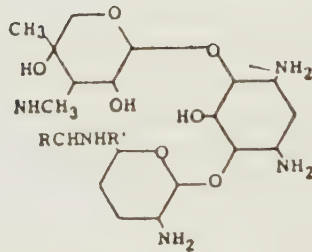
Hunden (*Staphylokokkus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*) die Mischung eines gefriergetrockneten Knochen – Gelatine – Materials, Cephalotin und Tobramycin (200 μ g Cephalotin + 2 mg Tobramycin/ml Knochen – Gelatine).

RANDZIO et al (1985) implantierte gentamicinhaltige TCP – Zylinder in Kiefer von Ratten. Eine verlangsamte Wirkstoffabgabe aus den Prüfkörpern konnte beobachtet werden.

2.3. Gentamicin

2.3.1. Struktur und biochemische Eigenschaften

Gentamicin ist ein wasserlösliches Aminoglycosid – Antibiotikum, das aus Mikro-
monospora – Arten (Genus Aktinomyetales) gewonnen wird. Es wurde zum
ersten Mal im Jahre 1961 klinisch eingesetzt (Antibiotika – Fibel 1975). Es ist
ein Wirkstoffkomplex aus drei verwandten Komponenten: C1a 27,8%, C1
29,5%, C2 42,7%, mit folgender Struktur (LUFT u. Mit. 1975):



GENTAMICIN

C₁ R=R'=CH₃

C₂ R=CH₃; R'=H

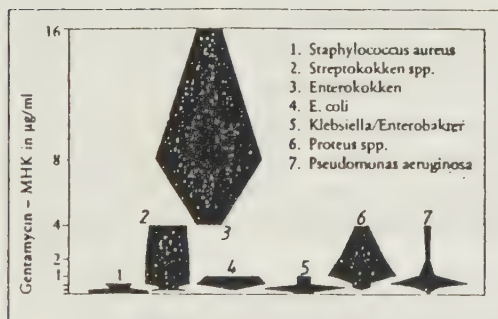
C_{1a} R=R'=H

Gentamicin ist durch folgende Eigenschaften charakterisiert (Antibiotika – Fibel
1975):

– Chemische Stabilität: Es ist sowohl bei niedrigeren als auch bei höheren
Temperaturen und in einem pH-Bereich von 2,2 bis 10 stabil. Auch im
Serum erweist es sich als ausgesprochen beständig (NEUMANN u.
AUWÄRTER 1968).

– Wirkungsspektrum: Das antibakterielle Spektrum von Gentamicin umfaßt die
wichtigsten grampositiven und gramnegativen Keime (s. Tab. 4).

Tab. 4 Die wichtigsten Erreger bei Knochen- und Weichteilinfektionen und ihre Gentamicin-empfindlichkeit (Septopal-Prospekt 1980)



- Wirkungsoptimum: Das Wirkungsoptimum liegt im alkalischen Bereich bei pH 7,8. Bei pH 6,6 sind 8-fach, bei pH 5,5 30-fach höhere Konzentrationen erforderlich.
- Wirkungsmechanismus: Gentamicin verfälscht bei proliferierenden Keimen die Proteinsynthese. Der Angriffspunkt ist die Translationsphase.
- Inaktivierung: Verschiedene Na-, K-, Mg- und Ca-Salze (Karbonat, Sulfat, Chlorid, Phosphat, Nitrat) reduzieren mit steigendem Salzgehalt im Nährmedium die Aktivität des Gentamicins um bis über das 30fache.
- Resistenzverhältnisse: Bei Hospitalismuskernen beträgt die Resistenzrate bis zu 30%.
- Serumeiweißbindung: Diese wird unterschiedlich angegeben (0%, 30%, 45%). RIFF (1971) hat anhand radioaktiv markierten Gentamicins herausgefunden, daß 10% an Erythrozyten und 30% an Plasmaproteinen gebunden werden.

- Sensibilisierung: Überempfindlichkeitsreaktionen sind sehr selten.
- Synergismus: Gentamicin kann mit Penicillin und Cephalosporinen synergistisch wirken.
- Antagonismus: Gentamicin sollte nicht mit Tetracyclinen und Chloramphenicol kombiniert werden.
- Nebenwirkungen: Gentamicin besitzt eine Ototoxizität, die sich nach längerer Anwendung bei hohen Dosierungen oder eingeschränkter Elimination primär als Vestibularis-Schädigung manifestiert (NEUMANN u. Mit. 1968). Es wirkt auch nephrotoxisch, besonders in höherem Lebensalter, und bei vorgeschädigten Nieren (LUFT und Mit. 1974, 1975, NEUMANN u. Mit. 1968). Gentamicin wird in den Nieren akkumuliert. Bei der Elimination beträgt die Halbwertszeit 109 Std. (LUFT u. Mit., 1974, 1975). Gentamicin verbindet sich mit den Zellmembranen. Als maximale therapeutische Konzentrationen im Serum werden 10 µg/ml angegeben (Antibiotika - Fibel, NEUMANN 1968).

2.3.2. Gentamicin als Wirkstoff eines Drug-Depots

Gentamicin wird wegen seiner guten Wirksamkeit gegen Staphylokokken und gramnegative Keime für die Behandlung der Osteomyelitis verwendet. Um die Probleme der unzureichenden Durchblutung des Osteomyelitisherdes einerseits und der Toxizität von Gentamicin andererseits in den Griff zu bekommen, werden angesichts der Vorzüge dieses Antibiotikums Versuche unternommen, es als Drug-Depot zur lokalen Applikation einzusetzen (ANDERSON 1981, SCHULTHEIS 1981, STEMBERGER 1983, REDL 1983, RANDZIO 1985). Antibakterielle Chemotherapeutika sollten i.A. folgenden Ansprüchen genügen (ANDERSON 1981):

1. Bakterizidie
2. Breites Spektrum
3. Geringe Toxizität
4. Geringe Resistenzbildung

Für die Verteilung des Wirkstoffes, der aus einem Drug-Depot abgegeben wird, gelten nach ANDERSON folgende Kriterien:

1. Ort der Implantation
2. Löslichkeit
3. Proteinbildung
4. Metabolisierung
5. Retardierungsfaktoren (Porosität, Dichte, Oberflächenversiegelung)
6. Organverteilung
7. Ausscheidung

2.4. Tricalciumphosphat (TCP)

2.4.1. Biologische, chemische und physikalische Eigenschaften

Tricalciumphosphat ($\text{Ca}_3\text{P}_2\text{O}_8$) ist eine Substanz, die in ihrem chemischen Aufbau den anorganischen Anteil des Knochens ähnlich ist. Sie wird aus Apatit gewonnen. Bedeutende Apatitlagerstätten befinden sich in Nordafrika und Florida (RÖMPP) Hydroxylapatit ($\text{Ca}_{10} (\text{PO}_4)_6 (\text{OH})_2$) ist bei höheren Temperaturen instabil. Bei $700-900^\circ\text{C}$ sinkt das Verhältnis Ca/P von 10/6 auf 9/6, das dem des TCP entspricht:



Das dadurch entstehende TCP hat eine tetragonale Struktur und wird als β -TCP bezeichnet. TCP verwandelt sich bei 1370°C zu α -TCP, das eine orthorhombische Struktur hat (HEIDE u. Mit., 1975, NEWSELY 1984) (s. Tab. 5).

*Tab. 5 Physikalische und kristallographische Daten von TCP
(nach Heide und Köster 1975)*

Verbindung	$\text{Ca}_3\text{P}_2\text{O}_8$
Oxidformel	$3 \text{CaO} \cdot \text{P}_2\text{O}_5$
Zusammensetzung	CaO 54,2
<u>Gewichtsprozent</u> P_2O_5	45,8
spez. Gewicht $[\text{g}/\text{cm}^3]$	3,14
Schmelztemperatur $[^\circ\text{C}]$	1720
α/β Umwandlungs- temperatur $[^\circ\text{C}]$	1370
Kristallsystem:	
α -phase:	orthorhombisch
β -phase:	tetragonal

TCP wurde während der letzten 15 Jahre in vivo und in vitro intensiv mit dem Ziel untersucht, diese Substanz als Knochenersatzmaterial anzuwenden (s. Tab. 6). Die Fragestellungen der durchgeführten Tierversuche bezogen sich auf die Biokompatibilität, den Knochenverbund, die Resorptionsrate und den Resorptionsprozeß.

Tab. 6 Tierversuche mit TCP

Autor/Jahr	Spezies	Material / Form	Liegedauer in Monaten	Untersuchungen
Bhaskar, 1971	Tibia von Ratten	TCP-Blöcke, 2 x 2 x 2 mm	3 ½	LM und EM
Karber, 1975	Tibia von Hunden	a) Aluminiumoxidkeramik, Zylinder- ϕ : 2,5 mm b) Kalziumphosphat, Zylinder- ϕ : 2,5 mm c) Kalziumphosphat + Kalziumaluminat Poren- ϕ : 0,8-1,0 mm	7	LM und FM
Mors, 1975	Gaumen v. Hunden	TCP-Implantat	6	LM und MR
Levin, 1975	Parodontale Defekte v. Hunden	a) Knochenmark b) TCP-Block, Poren- ϕ : 100-300 μ m	5 ½	LM
Köster, 1976	Tibia von Hunden	Zylinder, 5 x 15,5 mm aus: a) Mono - b) Di - c) Tri - d) Tetra - e) 20% Mono- und 80% Dikalziumphosphat Kalziumphosphat	1 ½	LM und REM
Rejda, 1976	Tibia v. Kaninchen	TCP-Zylinder, ϕ : 2,5 mm, Länge: 3 mm Mikroporosität: 30%, Poren- ϕ : >100 μ m Makroporosität: 20%, Poren- ϕ : >1-2 μ m	2	LM und REM
Köster, 1977	Tibia von Hunden	Segmentscheiben mit Röhrenporen von 45% Volumen, Dicke: 7 mm aus: a) TCP b) Tetrakalziumphosphat	10	LM und REM
Nelson, 1977	Tibia von Ratten	a) Polylactic-acid (PLA) u. Polyglycolic-acid (PGA) b) TCP-Granulat, ϕ : < 0,125 mm c) PLA/PGA+TCP: 50/50	6	LM
Köster, 1978	Hunde u. Schweine	TCP-Zylinder, ϕ : 5 mm, Länge: 15 mm - Granulat, Korn- ϕ : $\approx$ 2 mm - Scheibensegmente: ϕ : 15 mm, Höhe: 6-15 mm - Zahnimplantate	15	RÖ und LM
Kallenberger, 1978	Zellkulturen (Di- ploide Kaninchen- Fibroblasten)	TCP-Keramik-Pulver	—	LM
Köster, 1979	Tibia von Hunden	a) TCP-Granulat b) Kieferknochenspan c) autologe Spangiosa	8	LM
Boone, 1979	Bedeckung der Pulpa v. Affenzähne	TCP-Pulver (Synthos)	6	LM
Flores de Jacoby, 1979	Parodontalknochen von Hunden	Silberstift-TCP-Keramik Implantat	6	LM und FM

Tab. 6 (Fortsetzung) Tierversuche mit TCP

Autor/Jahr	Spezies	Material/ Form	Liegedauer in Monaten	Untersuchungen
Wagner, 1981	Unterkiefer oder Femur v. Kaninchen	Silberstift-TCP-Keramik Implantat	12	LM und FM
Walter, 1982	Unter die Bauch- haut von Ratten	massive, rechteckige TCP-Implantate	20	LM
Ochsner, 1983	Femur v. Hunden	a) reines TCP-Granulat b) TCP-Granulat und Fibrinkleber c) TCP-Granulat u. 25% Vol. autologe Spongiosa	6	FM
Jacobs, 1983	Kiefer v. Hunden	Zahnwurzelimplantate	5	LM
Uchida, 1984	Schädeldach von Ratten u. Kaninchen	Platten, ϕ : 3mm; Dicke: 1mm aus: a) Kalziumaluminat b) Hydroxylapatit c) TCP	3	LM und REM
Jacobs, 1984	Tibia von Mini-Schweinen	TCP-Granulat	6	LM
Osborn, 1984	Femur v. Ratten	a) TCP (β -Whitlockit) b) Hydroxylapatit	4	LM
Eitenmüller, 1984	Tibia von Hunden	a) TCP-Granulat + PVP-Jod b) TCP-Granulat + Fosfomycin c) TCP-Granulat + Flucloxacillin d) TCP-Granulat + autologe Spongiosa e) TCP-Granulat	9	LM
Klein, 1984	Tibia v. Kaninchen	4 Sorten von Kalziumphosphaten	9	LM, RA, MRA
Klein, 1985	Tibia v. Kaninchen	TCP-Zylinder, ϕ : 2,2mm; Höhe: 2,5mm (4 Variationen verschiedener Mikroporosität und Makroporosität)	16	LM
Wagner, 1985	Femur u. Unterkiefer v. Kaninchen	a) TCP-Zylinder, Höhe: 5mm aus porösem β -TCP b) TCP-Granulat, ϕ : 1-2mm c) HA-Granulat, ϕ : 1-2mm	12	LM und FM

Erläuterungen zur Tabelle 6:

ϕ für Durchmesser

EM für Elektronenmikroskopie

FM für Fluoreszenzmikroskopie

LM für Lichtmikroskopie

MR für Mikroradiologie

RA für Radiologie

REM für Rasterelektronenmikroskopie

RÖ für Röntgenaufnahme

Von den Verfassern einer Untersuchung ist nur der erste Name angegeben.

Biokompatibilität

TCP erwies sich bei der Implantation an Tieren und Menschen als knochenfreundliches Material, das kaum Fremdkörperreaktionen verursacht (BHASKAR et al, 1971, FLORES DE JACOBY et al, 1979, KÖHLER et al, 1980, KÖSTER et al, 1976, MORS et al, 1975, REJDA et al, 1976, RIES et al, 1978).

KÖSTER (1976) kam zu dem Ergebnis, das Calciumphosphat-Keramik mit einem $\text{CaO/P}_2\text{O}_5$ -Verhältnis von 3:1 die beste Verträglichkeit aufweist.

HORCH et al (1983) haben dagegen nach klinischer Anwendung der Keramik Spätkomplikationen beobachtet. Als Ursache vermuteten sie neben Fremdkörper- und eventuellen Immunreaktionen Unterschiede in der Kristallstruktur, Porengröße und Partikelgröße.

Nach Untersuchungen von KÖSTER et al (1977) und DRISKELL (1973) (zitiert n. METSGER et al, 1982) METSGER 1982) wurden in den lokalen Lymphknoten keine keramischen Partikel gefunden, während KLEIN (1985) berichtet, daß die lokalen Lymphknoten im Abflußgebiet von Calciumphosphat-implantaten viele Makrophagen mit Keramikpartikeln in ihrem Zytoplasma enthielten.

Nach DRISKELL (1973) waren bei Versuchstieren (Hunden) nach Keramik-implantation die Nieren frei von Calciumablagerung, ferner waren die Calcium- und Phosphatwerte des Serums normal.

Knochenverbund

TCP kann mit dem Knochen einen unmittelbaren, bindegewebsfreien Kontakt eingehen (JAKOBS 1983, KAISER et al, 1980, KÖSTER et al, 1976, KÖSTER et al, 1979, OCHSNER et al, 1984, REJDA et al, 1976, RIESS et al, 1978, STRUB et al, 1978). Die physikochemische Haftung am Knochen soll sich auf molekularer und kristalliner Ebene abspielen (NEWSELY 1984).

Der Abbau der oberflächlichen Keramikschicht kann Hand in Hand mit der Neubildung von Knochensubstanz gehen (KÖHLER 1980).

Nach HORCH et al (1983) verläuft die knöcherne Auffüllung kleinerer Knochendefekte schneller als die Resorption der Keramik. Bei Knochendefekten mit mehr als 20 mm Durchmesser können Knochenneubildung und Resorptionsvorgang zeitlich etwa parallel ablaufen. Es wird angenommen, daß auch die Porengröße der Keramik eine wichtige Rolle spielt. Der für die knöcherne

Durchwachsung optimale Porendurchmesser der Keramik liegt im Bereich von 400 – 800 μm . KARBE et al (1975) und UCHIDA et al (1984), sind der Ansicht, daß ein Porendurchmesser größer als 100 μm notwendig sei, damit die Knochenneubildung in den Keramikporen möglich wird. Nach NEWSELY (1984) sind Knocheneinsprossungen bei einem Porendurchmesser von 300 – 500 μm tragfähig.

BRADY und CUTRIGHT (1975) (zitiert n. STRUB, 1978) zeigen Keramik-implantate, die durch peripher liegende Osteoblasten infiltriert werden.

MORS und KAMINSKY (1975) finden in den Keramikporen Blutgefäße von normaler Größe.

Das durch gelöste Calciumphosphationen bestimmte Milieu in der Implantat-umgebung soll zur Stimulierung des Knochenwachstums auf der Implantat-oberfläche beitragen (KÖSTER et al, 1979, MORS et al, 1975, NEWSELY, 1984, WAGNER et al, 1981). NEWSELY (1985) charakterisiert den Ionenaustausch zwischen Keramik und Lagergewebe folgendermaßen: "Der Abgabe von Calcium- und Phosphationen in das Gewebe folgt die Einbeziehung in das gewöhnliche physiologische Regulationssystem; diese Bestandteile werden auf den normalen Bahnen des Stoffwechsel der Gewebe abge-schieden und fortbewegt."

GROWER et al (1973) (zitiert n. STRUB 1978) fand in der Umgebung von TCP-Implantaten eine Zunahme der alkalischen und sauren Phosphatase-aktivität, sowie des Phosphatgehaltes. Daraus folgern die Autoren, daß die biologisch abbaubare Keramik eine knochenneubildungsaktivierende Rolle spielen kann. Andere Untersucher bestreiten eine besondere osteogenetische Potenz durch Calciumphosphatkeramik (HORCH et al 1985).

KLEIN et al (1985) stellten nach der Implantation von verschiedenen TCP-Keramiken in der Tibia von Kaninchen ein Remodeling des Knochens um die Keramik herum fest.

Resorptionsrate

Nach NEWSELY (1984) sind die Resorptionsrate bestimmenden Faktoren noch nicht voll erkannt worden. Strukturelle, gefügebbezogene und textuelle Aspekte spielen eine Rolle (KLEIN u. Mit., 1985). Der biologische Abbau von TCP hängt nach KLEIN (1985) mit der Mikroporosität, der Kristallo-

graphie, der Stöchiometrie sowie mit den Sinterungsprozessen zusammen, weniger jedoch mit der Makroporosität. Abweichend von KLEIN (1985) schreiben UCHIDA et al (1984), daß zwischen der Resorptionsrate und der Makroporosität kein Zusammenhang bestehe. Sie betonen, daß die Resorptionsrate eines abbaufähigen Materials die Formation des neuen Knochens nicht überschreiten sollte.

KÖSTER et al (1976, 1977) weisen darauf hin, daß die Resorptionsrate des TCP sowohl von der funktionellen Belastung als auch von den an seinem Aufbau beteiligten kristallinen und glasigen Phasen abhängig sei. Nach einer anderen Studie ist der Resorptionseffekt von der Größe des Knochendefektes abhängig (KÖSTER et al, 1979).

Resorptionsprozeß

KLEIN et al (1984, 1985) zufolge beginnt der biologische Abbau an den dünnen Verbindungsstellen, die bei der Sinterung für den Zusammenhalt des Keramikornes sorgen. Sobald ein Partikel herausgelöst ist, wird es weggetragen und schwimmt in der extrazellulären Flüssigkeit frei. Auf diesem Wege kann es im physiologischen Kreislauf durch Phagozytose angegriffen werden. DRISKELL (1973) (zitiert n. METSGER, 1982) vermutet eine hydrolytische Auflösung des TCP. Nach JACOBS (1983), KÖSTER (1977), REJDA (1976) sind Osteoklasten aktiv an der Resorption von TCP beteiligt. Calciumkeramik wird von Phagozyten verschiedener Formen, die intrazelluläre Keramikpartikel speichern, phagozytiert (BHASKAR et al, 1971, KLEIN et al, 1985, OSBORN et al, 1984).

2.4.2. Klinische Anwendung

TCP hat in verschiedenen Anwendungsformen Eingang in die Oralimplantologie gefunden. Das TCP-Implantationssystem nach RIESS kombiniert resorbierbares TCP mit einem Zahnwurzelimplantat, um einen tragfähigen Knochenverbund herzustellen. RIESS (1978) hat 45 Wurzelimplantate bei 37 Patienten eingesetzt. Die TCP Implantate heilten innerhalb weniger Wochen komplikationslos ein. Allerdings fehlen langfristige Kontrolluntersuchungen.

JACOBS (1983) verwendete α -Tricalciumphosphat-Keramik zur Füllung großer Knochendefekte mit durchschnittlich über 20 mm Durchmesser nach Zystektomien bei 8 Patienten. Nach 9 Monaten Nachuntersuchungsdauer traten keine Komplikationen auf.

GABERTHÜEL und STRUB (1977) füllten am Menschen 29 parodontale Knochentaschen mit einer TCP-Paste. Die Gewebeverträglichkeit war gut; es kam zu keinen postoperativen Beschwerden.

KAISER et al (1980) verwendeten TCP zur Auffüllung von Knochendefekten. Bei 63 Patienten wurden Knochendefekte nach Wurzelspitzenresektionen, nach Zystektomien und nach Entfernung überzähliger Zähne bzw. Odontomen mit TCP aufgefüllt. Die Patienten wurden systematisch über einen Zeitraum bis zu 6 Monaten untersucht. Es trat eine hohe Komplikationsrate (33 %) in Form von Fistelbildung oder Abstoßung des Materials auf.

HORCH et al (1983) verschlossen bei 14 Patienten Knochendefekte im Kieferbereich nach Zystektomien mit einem feinkörnigen TCP-Granulat. Bei 5 Patienten (36 %) zeigten sich Komplikationen 1 - 2 Wochen nach der Operation in Form von Nahtdehiszenz und Fistelbildungen. In einer zweiten Therapieserie (HORCH et al, 1985) mit TCP-Granulat lag die Komplikationsrate bei 12 % (6 von 50 Patienten).

WALTER und MANG (1982) setzten TCP bei 194 Patienten zur Augmentation von Gesichtsdefekten ein, wobei kaum Komplikationen zu beobachten waren.

OSBORN und DONATH (1984) verwendeten TCP-Granulat bei 5 Patienten und Hydroxylapatitkeramik bei 6 Patienten zur Behandlung der Alveolaratrophie. Die Implantation von HA-Keramik bei der Extension des Alveolarfortsatzes führte zu beständigen Rekonstruktionsergebnissen, während eine Involution des Alveolarknochens in den mit TCP-Granulat verbreiterten Regionen beobachtet wurde.

3. Tierexperimenteller Teil

3.1. Fragestellung der vorliegenden Untersuchungen

Im Tierversuch an der Ratte möchten wir Hinweise über die Einheilung von verschiedenen resorbierbaren TCP – Zylinderimplantaten gewinnen, die als Passivmaterial zur Entwicklung eines gentamicinhaltigen Drug – Depot dienen sollen. Insbesondere interessiert die Frage, ob die gute Knochenverträglichkeit und das Resorptionsverhalten der Keramik durch den Antibiotikazusatz verändert wurde. Zur Klärung dieser Fragestellung wird gentamicinfreie und gentamicinhaltige Keramik zum Rechts – Links – Vergleich in die Femora von Ratten implantiert, und nach verschiedenen langen Phasen der Einheilung die Gewebereaktion des Knochens und Weichgewebes morphologisch untersucht. Außerdem soll die über den Urin ausgeschiedene Gentamicinmenge ersten Aufschluß geben über die Bioverfügbarkeit des freigesetzten Antibiotikums.

3.2. Material und Methode

3.2.1. Herstellung der Implantate

3.2.1.1. Herstellung der keramischen Matrices

Als Ausgangsmaterial für die keramischen Matrices dient synthetisch hergestelltes β – TCP – Pulver (Fa. HEYL und Co, Berlin). Das Pulver wurde unter Verwendung von Preßhilfsmitteln auf einer Exzenterpresse mit definiertem Preßdruck zu zylindrischen Formkörpern verarbeitet. Dieses Verfahren ermöglicht es, Matrixkörper mit konstanten Dichtewerten serienmäßig herzustellen. Die Formlinge wurden anschließend bei einer Temperatur von 1300°C gebrannt. Beim Brand verflüchtigten sich die Hilfsstoffe und es entstanden poröse keramische Matrices aus β – TCP, wie durch die Röntgenstrukturanalyse (Fa. Heyl u. Co., 1984) nachgewiesen werden konnte. Physikalische Werkstoffdaten gehen aus Tabelle 7 hervor.

Tabelle 7: Physikalische Werkstoffdaten

Durchmesser:	0,296cm
Höhe:	0,40cm
Gewicht:	0,0646g
Dichte:	2,34g/cm ³
Prozent. theor. Dichte:*	78%
Relative Standardabweichung der Dichte:	0,5%
Porosität:	22%

* bezogen auf β – TCP (3,01 g/cm³)

3.2.1.2. Beladung mit Wirkstoff

Auf die Matrices hat man das Antibiotikum Gentamicin – Sulfat in gelöster Form aufgebracht. Anschließend wurde das Lösungsmittel (Wasser) durch Trocknung entfernt. Jeder Körper enthielt 1,5 mg Gentamicin – Sulfat. Das Aufbringen des Wirkstoffes erfolgte unter aseptischen Bedingungen. *

3.2.2. Versuchsdurchführung

Die tierexperimentellen Untersuchungen wurden an 10 Ratten vorgenommen. Zum Rechts – Links – Vergleich hat man gentamicinhaltige und antibiotikumfreie Keramikzylinder in die Femora implantiert und nach unterschiedlichen Liegezeiten lichtmikroskopisch, fluoreszenzmikroskopisch, röntgenologisch und mikroradiographisch untersucht.

* Das Herstellungsverfahren der Prüfkörper ist von Herrn Apotheker R. ALEX (Institut für Pharmazie und Lebensmittelchemie der Ludwig – Maximilians – Universität München, Vorstand Prof. Dr. K. THOMA) entwickelt und durchgeführt worden.

3.2.2.1. Operationstechnik

Die Tierversuche wurden an ca. 3 Monate alten, ca. 300 g schweren weiblichen Sprague – Dawley – Ratten durchgeführt. Die Betäubung der Ratten erfolgte mit Ätherdampf und Chloralhydrat (3,4%, ca. 2 – 4 ml) intraperitoneal. Auf der lateralen Seite der beiden Femora auf Höhe des Trochanter major wurden Haut und Fascien durchtrennt und die Muskeln vom Knochen abpräpariert. Im Bereich des Trochanters wurde monocortikal eine Bohrung mit 3 mm Durchmesser angebracht und jeweils ein TCP – Zylinder implantiert. Die Zylinder rechts enthielten je 1,5 mg Gentamicin, links blieben sie ohne Zusatz. Vor der Einpflanzung der Prüfkörper in das Bohrloch wurden die Bohrspäne durch intensive Spülung mit physiologischer Kochsalzlösung entfernt. Die gentamicinhaltigen Keramikzylinder hat man in ein möglichst blutfreies Bohrloch eingebracht, wobei anschließend keinerlei Spülungen mehr stattfanden, um eine vorzeitige Elution des Antibiotikums zu vermeiden. Der Wundverschluß erfolgte mit Einzelknopfnähten. Unmittelbar nach der Implantation wurden die Tiere einzeln in Stoffwechselkäfigen (Fa. ACME, Metal Products, Chicago 111., USA) gehalten, und erhielten normale Nahrung (Altromin – Trockenfutter und Wasser).

3.2.2.2. Untersuchungstechnik

Verweildauer

Je zwei Tiere wurden in Zeitabständen von 4, 10, 14, 30, 42 Wochen durch Ätherdampfüberdosis getötet (s. Tab. 8).

Tab.8 Verweildauer der Implantate

<i>Tier</i>	<i>Verweildauer in Wochen</i>
0407	4
0409	4
0408	10
0410	10
0403	14
0404	14
0401	30
0402	30
0405	42
0406	42

Untersuchungen zur Wirkstofffreisetzung *

Der von Nahrungsresten und Faeces abgetrennte Urin wurde in 24 - stündigen Intervallen entnommen und sofort auf -25°C bis zur Auswertung tiefgefroren.

* Diese Untersuchungen sind von Herrn Apotheker R. ALEX (Lehrstuhl für Pharmazie und Lebensmittelchemie der Universität München, Vorstand Prof. Dr. K. THOMA) durchgeführt worden.

Die Sammelvorrichtungen der Käfige wurden täglich gereinigt. Vor der Bestimmung des Wirkstoffgehalts wurden die aufgetauten Urinproben mit isotoner Phosphat-Pufferlösung pH 7,4 im Meßkolben auf ein definiertes Volumen aufgefüllt. Anschließend wurde auf für den Test erforderliche Konzentrationen mit Phosphatpufferlösung verdünnt. Die Auswertung der Proben erfolgte mikrobiologisch nach dem Agar-Diffusionstest und Lochplattentest gegen eine Gentamicin-Standard-Verdünnungsreihe in Phosphat-Pufferlösung.

Der Test wurde auf quadratischen Testplatten (Fa. NUNC, DK-4000 Roskilde) mit einer Kapazität von 36 Proben- und Standartwerten pro Platte durchgeführt. Als Testkeim diente *Bacillus subtilis* ATCC 6633. Die Einsaatdichte lag bei 10^6 Keimen/ml Agar. Als Agarmedium wurde Antibiotika-Agar Nr. 5 nach GROVE und ANDALL ((Fa. MERCK, D-6100 Darmstadt) verwendet; die Agar-Schichtdicke betrug 4 mm. Es konnten Wirkstoffkonzentrationen bis etwa $0,01 \mu\text{g/ml}$ nachgewiesen werden. Quantitative Messungen waren bis zu einer Konzentration von etwa $0,05 \mu\text{g/ml}$ durchführbar.

Postoperative Röntgenaufnahmen

Zur postoperativen Kontrolle wurden intravitale Röntgenaufnahmen von den Femora der Tiere nach 14 Wochen (Tier 0401, 0402, 0403, 0404, 0405, 0406) bzw. nach 30 Wochen (Tier 0401, 0402, 0405, 0406) angefertigt. Außerdem hat man nach Tötung der Tiere von den entnommenen Femora mit Hilfe einer Siemens-Röntgenkugel (60 kV, 10 mA) Aufnahmen hergestellt (DU PONT CRONEX 4 SAFETY-Filme). Der Focus-Film-Abstand betrug 30 cm, die Belichtungszeit 2 1/2 sec..

Fluorochrommarkierung

Die Tiere wurden in gewissen Zeitabständen (siehe Tab. 9) intravital mit Fluorochromen markiert, um die Umbauvorgänge des Knochens beurteilen zu können (RAHN et al, 1970, 1971). Die Reihenfolge der Fluorochrome, die Dosis und der Zeitpunkt der Markierung sind in der Tabelle Nr. 9 zusammengefaßt.

Tab. 9 Markierung der Tiere mit Fluorochromen

Tier	Fluorochrome	Konzentration [mg/ml]	Dosis [mg/kg]	Dosis [mg]	Markierung postoperativ nach ..Wochen	Totung d. Tiere nach ..Wochen
0407 0409	1. Hostacyclinsaft*	50	300	2x100 po.	4	4
0408 0410	1. Hostacyclinsaft 2. Xylenolorange**	50 30	300 90	2x100 po. 30 ip.	4 10	4 10
0403 0404	1. Hostacyclinsaft 2. Xylenolorange 3. Calceinblau**	50 30 30	300 90 30	2x100 po. 30 ip. 10 ip.	4 10 14	14
0401 0402	1. Hostacyclinsaft 2. Xylenolorange 3. Calceinblau 4. Alizarincomplexon** 5. Hostacyclinsaft	50 30 30 30 50	300 90 30 30 300	2x100 po. 30 ip. 10 ip. 10 ip. 2x100 po.	4 10 14 18 22	30
0405 0406	1. Hostacyclinsaft 2. Xylenolorange 3. Calceinblau 4. Alizarincomplexon 5. Hostacyclinsaft	50 30 30 30 50	300 90 30 30 300	2x100 po. 30 ip. 10 ip. 10 ip. 2x100 po.	4 10 14 18 22	42

Erläuterung : pa. $\hat{=}$ peroral
ip. $\hat{=}$ intraperitoneal

Hersteller : * Hoechst AG (Frankfurt am Main)
** Herr Apotheker R. Alex (Institut für Pharmazeutische
Technologie der LUDWIG-MAXIMILIANS
-UNIVERSITÄT MÜNCHEN)

Herstellung der histologischen Präparate

Für die lichtmikroskopischen Untersuchungen sind die Femora mit umliegendem Weichgewebe und Prüfkörper, die Lymphknoten der paraortalen Region und die Milzen der Versuchstiere herangezogen worden.

Im einzelnen sind die Milzen und die regionalen Lymphknoten der Tiere 0401, 0402, 0405 und 0406 entnommen worden, wobei man ein Operationsmikroskop

(Vergrößerung 6x) zu Hilfe nahm. Die unmittelbar nach der Entnahme in Formalinlösung fixierten Lymphknoten und Milzen wurden in Paraffin eingebettet. Neben der H.E.-Färbung ist zum Nachweis eventueller Calciumphosphat-Spuren die Färbung nach KOSSA angewendet worden (ROMEIS 1968). Der Eisennachweis erfolgte durch die Berliner Blau-Reaktion.

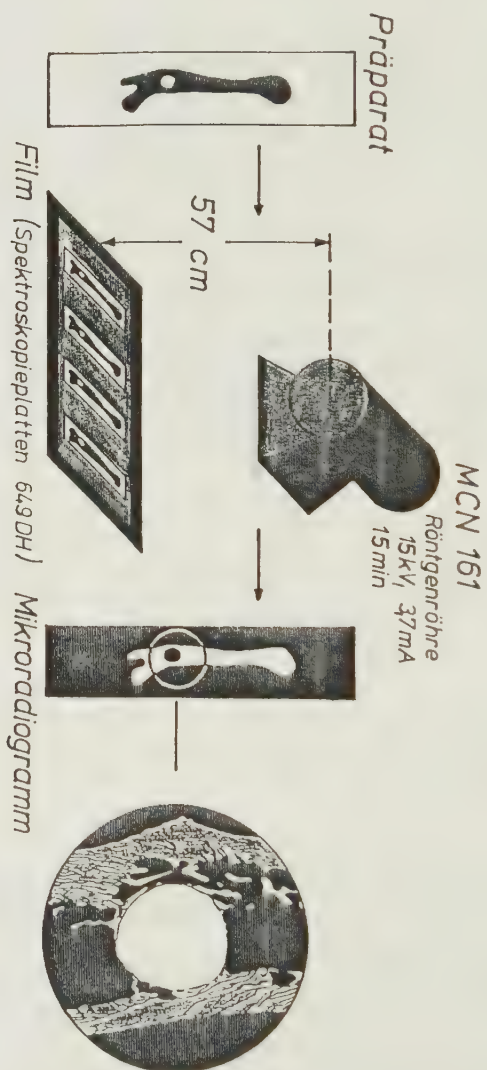
Die Femora wurden unmittelbar nach der Entnahme in Akrylatfixans nach EDER fixiert, um unentkalkte Acrylatschnitte anzufertigen. Nach Einbettung in Polymethacrylat wurden die nicht entkalkten Femora gemeinsam mit dem Keramikzylinder in der Diamantinnenlochsäge (LEITZ 1600) zu ca. 50 μ m dicken Serienschnitten verarbeitet.

Die Schnitte wurden nach der Methode von KOSSA und mit Methylenblau bzw. Toluidinblau gefärbt und mit Eukit auf dem Glasträger eingedeckt.

Für die Fluoreszenzmikroskopie blieben die Schnitte ungefärbt. Von den 50 μ m dicken Femoraschnitten der letzten 2 Tiere (0405, 0406) wurden Mikroradiogramme hergestellt*. Die Methode ist schematisch in der Zeichnung 1 dargestellt.

* Für die Anfertigung der Mikroradiogramme bedanke ich mich herzlichst bei Herrn Dipl. Physiker M. Schätzl (Radiologisches Forschungszentrum, Klinikum Großhadern, Universität München)

Zeichnung 1 MIKORADIOGRAPHIE



4. Ergebnisse der eigenen Tierversuche

4.1. Postoperativer Verlauf

Alle Tiere haben die Eingriffe überlebt und zeigten eine gute Wundheilung ohne Komplikationen. Die Tiere belasteten die operierten Gliedmaßen in physiologischer Weise, soweit die Käfighaltung dies zuließ. Eine Gewichtszunahme wurde registriert (Tab. 10).

Tab. 10 Körpergewichtszunahme der Tiere

<i>Tier</i>	<i>Zeitspanne zwischen Operation und Tötung in Wochen</i>	<i>Gewichtszunahme in Gramm</i>
0407	4	0
0409	4	Abnahme -5
0408	10	10
0410	10	20
0403	14	90
0404	14	80
0401	30	160
0402	30	170
0405	42	150
0406	42	200

4.2. Ergebnis der Freisetzungsprüfung von Gentamicin

Die Ausscheidung von aktivem Gentamicinsulphat im Rattenurin wurde bis zum 14. Versuchstag quantitativ mit Hilfe einer mikrobiologischen Nachweismethode bestimmt. Wie aus Tabelle 11 hervorgeht, erfolgte am ersten Tag die Abgabe von etwa 75% der insgesamt ausgeschiedenen Wirkstoffmenge als Initialdosis. Danach wurden über einen Zeitraum von etwa 2 Wochen kleinere Wirkstoffkonzentrationen im Urin gemessen. Auch nach dem 14. Freisetzungstag sind noch Gentamicinspuren im Urin nachweisbar (s. Tab. 11).

4.3. Röntgenologische Ergebnisse

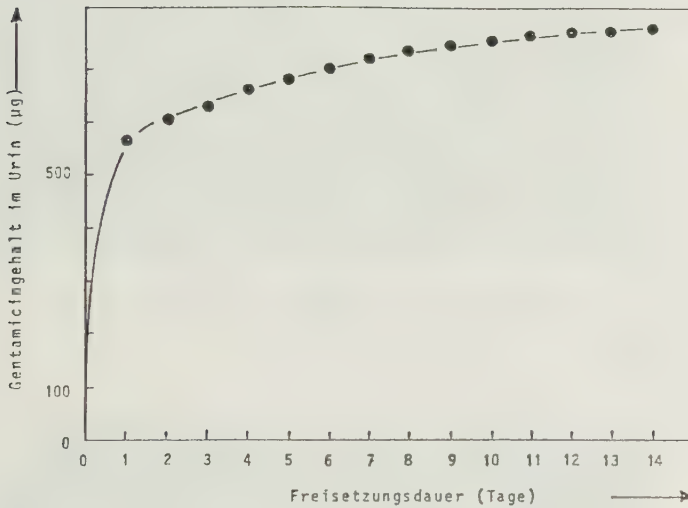
Bei der Verlaufskontrolle stellte sich heraus, daß zahlreiche Femora im Bereich des Bohrloches frakturierten (s. Tab. 12). In diesen Fällen lag der Prüfkörper teilweise wie ein 'Sperrknochen' zwischen den Fragmenten oder frei in der Muskulatur.

Bei dem Tier 0402 (links) verlief die Bruchstelle mitten durch das Implantat so daß sich an beiden Bruchenden mit dem Knochen verwachsene TCP-Teile befanden. Offensichtlich ist die Spontanfraktur erst eingetreten, nachdem der Keramikzylinder bereits fester mit dem Knochen verwachsen war. Auch nach der Fraktur geht der Knochen nahtlos ohne erkennbare Zwischenschicht in die Keramiksubstanz über (Abb. 1).

Die Röntgenaufnahmen der intakten Femora zeigten eine gute Einheilung des TCP-Keramikstifts im Knochen. Der im Kontakt mit dem Implantat befindliche Knochen besaß die gleiche Radiodensität wie der benachbarte Knochen. Die erkennbaren Spongiosastrukturen und Gelenkflächen waren unauffällig. Der Kalksatzgehalt der operierten Femora erschien im Vergleich der übrigen dargestellten Skelettknochen nicht gemindert, soweit es durch visuelle Auswertung zu beurteilen war. Es fanden sich auch keine ektopischen kalkdichten Schatten, weder im Operationsbereich noch in der Region der abführenden Lymphwege des unteren Bauchraumes.

Eine Auflockerung des Prüfkörpers war nicht festzustellen. Im Gegensatz zur Mikroradiographie waren makroskopisch an der Keramik keinerlei Resorptionen zu beobachten (Abb. 2).

Tab. 11 Kumulative Freisetzung von Gentamicinsulfat aus B-TCP-Keramikkörpern nach Implantation im Femurknochen bei Ratten (n=10).



(Implantationsversuch Mai/Juni 1984; Dr.Randzio, Alex, Papadopolou)

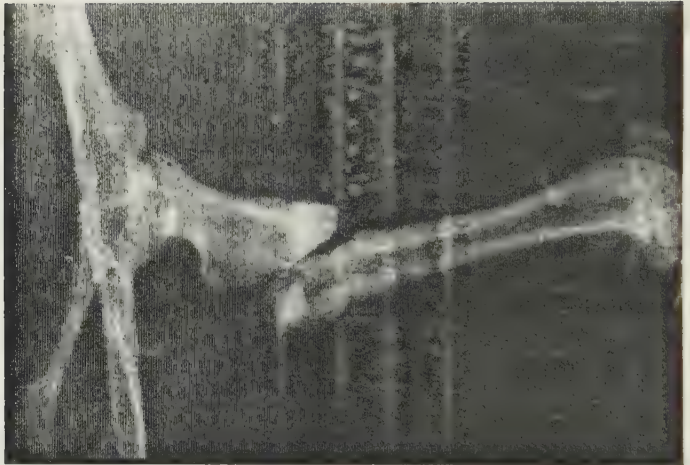


Abb. 1: Tier 0402, 6 Mon. p.o.; Intravitale Röntgenaufnahme des linken Femurs mit dem implantierten TCP-Zylinder. Die Spontanfraktur lief mitten durch den TCP-Keramikstift. An beiden Bruchenden befindet sich mit dem Knochen fest verwachsenes TCP.

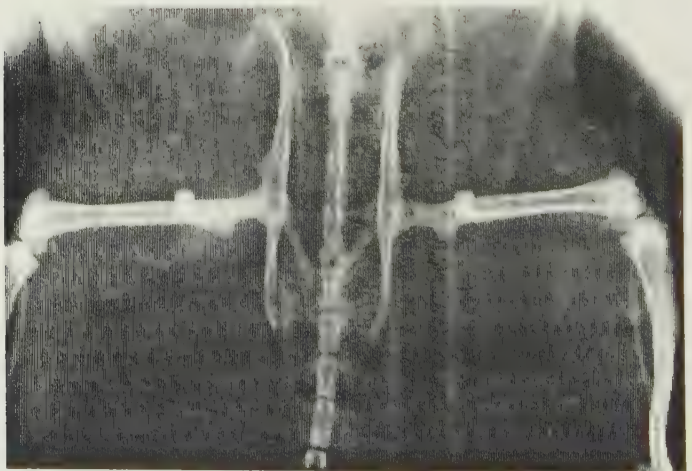


Abb. 2: Tier 0406, 3 Mon. p.o.; Intravitale Röntgenaufnahmen der Femora mit dem implantierten TCP-Zylinder. Der TCP-Prüfkörper zeigt eine gute Einheilung mit dem Knochen. Die kaudale Cortikalis blieb während der Operation intakt.

Tab. 12 Lage des Implantates

Tier	Fraktur		Lage des TCP—Keramikstiftes	
	links	rechts	links	rechts
0401	∅	+	im Knochen	in der Pseudarthrose
0402	+*	+	im Kontakt mit beiden Frakturstümpfen	in der Muskulatur
0403	+	+	in der Pseudarthrose	in der Muskulatur
0404	+	+	in der Muskulatur	in der Muskulatur
0405	+	+	in der Pseudarthrose	in der Muskulatur
0406	∅	∅	im Knochen	im Knochen
0407	+	∅	in der Pseudarthrose	im Knochen
0408	+	+	in der Pseudarthrose	in der Muskulatur
0409	+	+	in der Pseudarthrose	in der Muskulatur
0410	∅	+	im Knochen	in der Muskulatur

Erläuterung zur Tab. 12, Spalte Fraktur :

- ∅ keine Fraktur
 - +
 - +*
- Femurfraktur
Implantatbruch

4.4. Histologische Untersuchungen von Lymphknoten *

Insgesamt sind 15 Lymphknoten histologisch untersucht worden (siehe Tab.13 u. Zeichnung 2). Makroskopisch waren lediglich Verfärbungen (grünlich, bräunlich) in unterschiedlichem Ausmaß festzustellen, die auf operationsbedingte Einwirkungen zurückgeführt wurden. Feingeweblich erschienen die Lymphknoten im Lichtmikroskop im Wesentlichen gleichartig. Sie zeigen eine deutliche Sinushistiozytose im Bereich der Sinus, wobei die histiozytären Zellen oft ein feinkörniges, braunes Pigment gespeichert haben. In der Eisenfärbung reagiert es positiv, es handelt sich also um Eisenpigment. Dieses Pigment färbt sich gelegentlich auch mit der KOSSA - Färbung an.

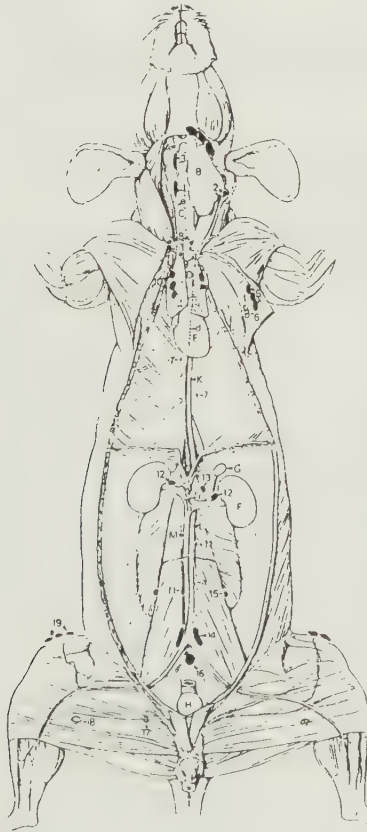
Ein doppelbrechendes Material oder feinkörnige, mit der Eisenreaktion negativ reagierende Ablagerungen sind nirgends nachweisbar. Kristalline Ablagerungen von TCP lassen sich nicht erkennen. Das Eisenpigment ist reizlos in den Makrophagen abgelagert. Es findet sich auch keine epitheloidzellige oder riesenzellige Reaktion, die als Fremdkörperreaktion gedeutet werden könnte. Lediglich in einem Lymphknoten liegt eine etwas auffällige Vermehrung eosinophiler Granulozyten vor. Es ist in diesen Lymphknoten auch eine im Vergleich zu den anderen deutlich verstärkte Kernrümmerphagozytose vorhanden, die feingeweblich überprüft wurde. Die Liegezeit der Keramik betrug 30 bzw. 42 Wochen.

4.5. Histologische Untersuchungen der Milz

Von den Tieren Nr. 0401, 0402, 0405, 0406 ist die Milz intravital entnommen worden. Die Milz ist jeweils regelrecht aufgebaut. In der roten Pulpa ist eine starke Siderinspeicherung mit reichlich nachweisbaren eisenpositiven Pigmenten in den hier massenhaft vorkommenden Makrophagen vorhanden. Die Architektur der Milzfollikel ist nicht gestört. Es finden sich keine partikulären Strukturen, die auf die Anwesenheit von TCP - Keramik schließen lassen.

* Die feingewebliche Beurteilung der Lymphknoten- und Milzpräparate hat freundlicherweise Herr PD Dr. PERMANETTER (Pathologisches Institut der Universität München, Direktor Prof. Dr. M. EDER) durchgeführt.

Zeichnung 2 Das lymphatische System der Ratte (nach Hebel)



Lymphatic system (lymph nodes of organs partly removed) 1, lymphocentrum mandibulare, 2, lc. cervicale supf, 3, lymphonodus cervicalis cran., 4, ln. cervicalis caud., 5, lnn. axillares proprii, 6, lnn. axillares accessorii, 7, ln. thoracicus aorticus, 8, ln. sternalis cran., 9, lnn. mediastinales ventr., 10, lnn. mediastinales dors., 11, ln. lumbalis aorticus, 12, ln. renalis, 13, ln. cisternales, 14, lnn. iliaci mediales, 15, ln. iliacus lat., 16, ln. sacralis hypogastricus (for modifications see text), 17, lc. ischiadicum, 18, lc. popliteum, 19, lc. inguinolemorale, a, truncus lumbalis, b, v. intestinalis, c, cisterna chyli, d, ductus thoracicus, e, tr. trachealis, A, gl. thyroidea, B, gl. mandibularis, C, trachea, D, thymus, E, heart, F, kidney, G, adrenal gland, H, ur. naiv bladder, I, anus, K, aorta descendens, L, aorta abdominalis, M, v. cava caud. (Drawing by B. Ruppel)

Tab. 13 Makroskopische Befunde der Lymphknoten
nach der Implantation von TCP-Keramik

Tier	Liegedauer der Keramik in Wochen	Anzahl der untersuchten Lymphknoten	Lokalisation	Befund
0401	30	4	iliaci mediales(links) iliaci mediales(rechts) sacralis hypogastricus lumbalis aorticus	makroskopisch etwas ver- größert; gelbgrün mit schwärzl. Anlagerungen unauffällig; gelbl. Farbe mit glatter Oberfläche makroskopisch unauffällig leicht gelbl. verfärbt; keine Anlagerung sichtbar
0402	30	4	iliaci mediales(links) iliaci mediales(rechts) sacralis hypogastricus lumbalis aorticus	leicht braun verfärbt leicht braun verfärbt makroskopisch unauffällig makroskopisch unauffällig
0405	42	4	iliaci mediales(links) iliaci mediales(rechts) sacralis hypogastricus inguinofemorales (re.)	makroskopisch unauffällig
0406	42	3	iliaci mediales(links) iliaci mediales(rechts) sacralis hypogastricus	makroskopisch unauffällig
		n=15		

4.6. Histologische licht- und fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen der Femora

Intakte Femora

Tab. 14 zeigt, welche Femora intakt geblieben sind; außerdem sind die Liegedauer der TCP - Stifte sowie die jeweilige Resorption des TCP vermerkt.

Tab. 14

Tier	Intakte Femora		Liegedauer TCP in Wochen	Resorption
	links	rechts		
0407		+	4	punktuell
0410	+		10	ca. $\frac{4}{5}$
0401	+		30	punktuell bis $\frac{1}{3}$ (je nach Schnitt)
0406	+	+	42	re.: punktuell bis $\frac{1}{4}$ (je nach Schnitt) links: punktuell

Tier 0407 rechtes Femur

Lichtmikroskopie

Der Spalt zwischen Knochen und TCP–Stift ist teilweise durch teils lamelläres teils geflechtartiges, neu gebildetes Knochengewebe aufgefüllt. An den Stellen, wo der neue Knochen das Implantat erreicht hat, sind gelegentlich minimale Resorptionen an der Oberfläche der Keramik zu beobachten, erkennbar an der unregelmäßig gezackten Begrenzungslinie (Abb. 3, 4).

Vereinzelt sieht man punktförmige Resorptionshöhlen im Inneren des Keramikkörpers dicht unter der Oberfläche. Typisch für die Resorptionen des Keramikmaterials erscheint die Strukturauflockerung, durch die Einzelkörner erkennbar werden. In manchen Resorptionslakunen sind Fibroblasten in reichlicher Grundsubstanz, Blutgefäße und Osteoblasten im Osteoidsaum in Kontakt mit der Keramik zu finden.

An den Stellen, an denen der Prüfkörper noch keinen Kontakt zum Knochen hat, ist der Implantatzylinder von einer lockeren Bindegewebshülle umgeben. Die Oberfläche des Implantates weist hier einen glattlinigen Verlauf auf. Resorptionslakunen sind hier nicht zu beobachten (Abb. 5).

Das Knochenmark mit Zellen der Erythro– und Granulopoese und den Megakaryozyten erscheint normal.

In einem anderen Schnitt ist zu sehen, daß der Prüfkörper nicht vollständig von Knochen umgeben ist. Hier kommt der Prüfkörper teilweise in Kontakt mit dem Weichgewebe. An diesen Kontaktstellen ist der Prüfkörper von einer Bindegewebskapsel mit oberflächenparallelen Fasern umgeben.

Das Implantat weist dort eine raue Oberfläche auf, die danebenliegende Kortikalis zeigt mottenfraßartige Resorptionen mit kleinen, arradierten Knochen-spänen im Weichgewebe (vermutlich eine Folge des Operationstraumas mit Deperiostierung). Die Osteozytenhöhlen sind gefüllt, Zeichen einer chronischen oder akuten Entzündung sind nicht erkennbar.

Fluoreszenzmikroskopie

Das Tier hat 6 Wochen nach der Operation eine perorale Gabe von Tetracyclin an 2 Tagen erhalten. Dementsprechend erkennen wir gelb fluoreszierende

Einlagerungen als dünne Bänder teils im Periost der Außencompakta, teils in der endostalen Zone unregelmäßig verteilt. Der im ehemaligen Bohrlochdefekt um den Prüfkörper regenerierende Knochen zeigt Fluoreszenz in den Osteozytenhöhlen und im Bereich der Osteoidsäume. Die Wachstumsrichtung der Knochenregenerate geht vom umliegenden Lagerknochen aus.

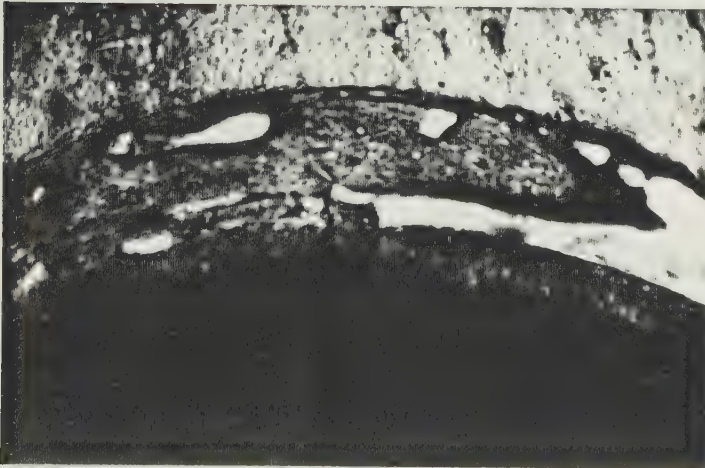


Abb. 3: Tier 0407, re Femur. Der Spalt zwischen Keramik und altem Knochen ist teilweise mit neugebildetem Knochen ausgefüllt. Gefäße, Knochenmarkräume und Osteozyten sind zu beobachten. Vergrößerung 80fach, Färbung: KOSSA, Methylenblau.

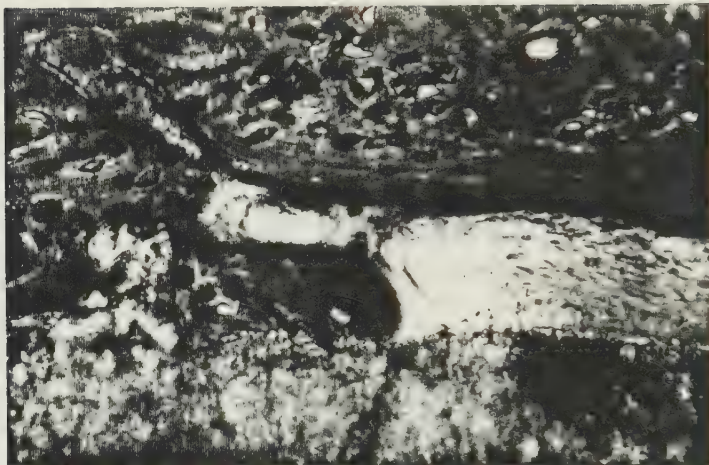


Abb. 4: Tier 0407, re Femur. Ausschnittvergrößerung aus der Abb. 3. Der neue Knochen ist teilweise lamellär (in der Mitte), teilweise geflechtartig (rechts und oben) ausgebildet. Der Knochen – Keramik – Kontakt ist bindegewebstfrei. In diesem Bereich kann eine Auflockerung und minimale Resorptionen der Keramik beobachtet werden (Knochen – Keramikrand links). Vergrößerung 320fach, Färbung: KOSSA, Methylenblau.

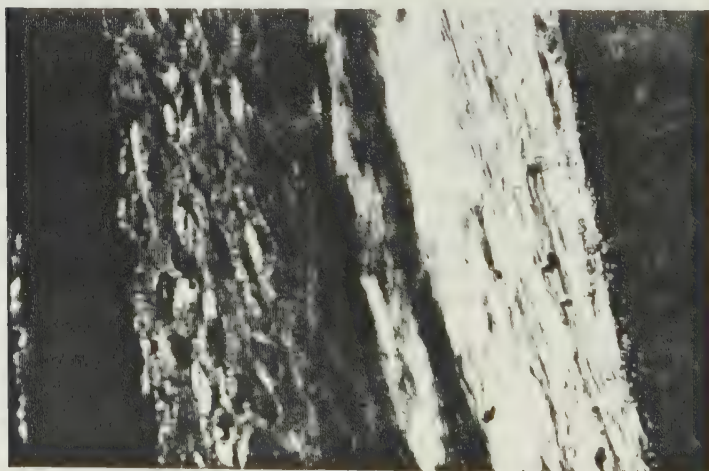


Abb. 5: Tier 0407, re Femur. Das Implantat (rechts) ist von einem zellreichen Bindegewebe umgeben, das durch Knochen ersetzt wird (Mitte). Die Oberfläche des Zylinders weist einen glattlinigen Verlauf auf. Vergrößerung 320fach, Färbung: KOSSA, Methylenblau.

Tier 0410 linkes Femur

Lichtmikroskopie

Auch hier scheint die Vorbohrung geringfügig größer ausgefallen zu sein, als der Durchmesser des Zylinderimplantats erfordert hätte. Der verbleibende Spaltraum zwischen Knochen und Keramik ist durch überwiegend geflechtartigen Knochen ausgefüllt. Bei der Eingliederung ist die Bohrung etwas exzentrisch gelegt worden, so daß der Prüfkörper mit seiner Längsachse die kortikale Begrenzung der Markhöhle unterbricht. In diesem Bereich hat an der endostalen und periostalen Seite der Kompakta eine ausgiebige, geflechtartige Knochenneubildung stattgefunden, die zu einer spindeligen Auftreibung der Kompakta geführt hat. Das mineralisierte zellreiche Knochengewebe enthält viele Markräume mit Spongiosabälkchen. Insgesamt erscheint die Struktur des neuen Knochens unregelmäßig verwoben (Abb. 6).

Im Bereich der periostalen Auftreibung findet sich auch auf anderen Schnitten anstelle des Geflechtknochens Säulenknorpel, der teilweise die Keramik direkt berührt und dann wie eine Kallusspindel in Bindegewebefaserzüge übergeht. Während in diesem Bereich der Keramikzylinder eine glattrandige Kontur aufweist, zeigen die vom Knochen umgebenen Oberflächen eine mottenfraßartige Arrosion, die gut 4/5 der überschaubaren Circumferenz erfaßt. Die Auflösung der Keramik führt dazu, daß einzelne Schollen vom Prüfkörper abgelöst im mineralisierten Knochen liegen. Neben den oberflächlichen Arrosionen finden sich umschriebene Lichtungen innerhalb des Keramikkörpers nicht weit von der Oberfläche, die vermutlich durch Resorptionsgänge ähnlich wie Bohrkanäle entstanden sein müssen. Bei stärkerer Vergrößerung erkennt man, daß sich in den Arrosionszonen einzelne Keramikpartikel vom Zylinder ablösen und ohne besondere zelluläre Reaktionen im umliegenden mäßig zellreichen Gewebe liegen. Die Arrosionstellen sind zumeist mit kanalartigen Strukturen im Knochen vergesellschaftet; teilweise lassen sich Verbindungen zu den Havers'schen Kanälen erkennen. Dort, wo diese Kanälchen in einer Arrosionshöhle in der Keramik enden, sieht man neben abgelösten Keramikpartikeln spindelige Bindegewebszellen und ovalären Zellen mit etwa 1–2 Nukleoli und eine deutlich blau gefärbte Kernmembran, während das Zytoplasma kaum erkennbar ist. Daneben finden sich Osteoblasten in Osteoidsäumen. Vereinzelt sind

mehrkernige Riesenzellen unmittelbar an der Keramikoberfläche zu erkennen (Abb. 7).

Auf anderen Schnitten des gleichen Femurs findet sich in der Überganszone Kompakta zu Keramik ein Areal, wo der kompakte und endostale Knochen teilweise leere Osteozytenhöhlen und bogige Resorptionslakunen aufweist. Die Keramik erscheint hier ebenfalls tiefgehend arrodirt. Insgesamt ist dieses Gebiet nur schwach gefärbt, so daß sich zelluläre Elemente in hartgewebefreien Zonen nicht differenzieren lassen. Als Ursache für diese Veränderung käme eine Hitzenekrose bei der Bohrung in Frage.



Abb. 6: Tier 0410, II Femur, Querschnitt des Prüfkörpers. Hier wird die Keramik (rechts) durch neugebildeten geflechtartigen Knochen, vom Periost (oben), Cortikalisbohrfläche (Mitte) und Endost (unten) ausgehend, umgeben. Die Keramik weist viele Resorptionsbucht auf, erkennbar an der unregelmäßig gezackten Oberfläche. Vergrößerung 25fach, ungefärbtes Präparat.

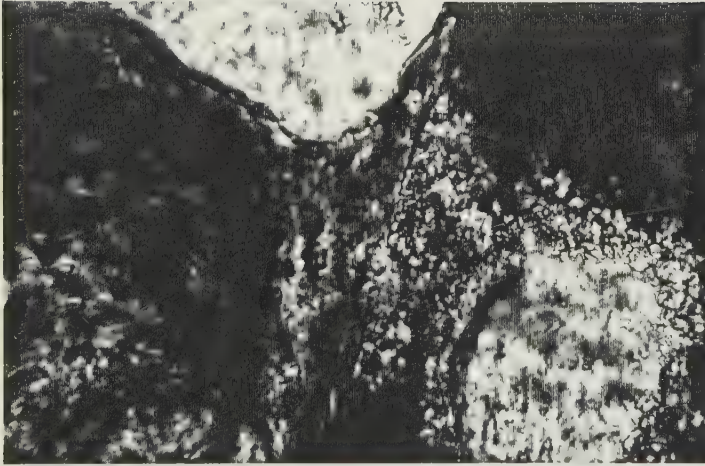


Abb. 7: Tier 0410, li Femur, Parallelschnitt zur Abb. 6. Eine Arrosionsstelle im Inneren des TCP – Zylinders zeigt zahlreiche resorptive Zellen. In der Resorptionshöhle erkennt man links einen Osteoblast im Osteoidsaum. Die Keramik – Knochen – Grenze erscheint in der Mitte des Bildes durch eine resorptive, mehrkernige Riesenzelle unterbrochen. Vergrößerung 320fach, Färbung: KOSSA, Methylenblau.

Fluoreszenzmikroskopie

Wie aus Tabelle 9, (S.30) ersichtlich, hat das Tier 0410 4 Wochen postoperativ eine Dosis Tetracyclin und 10 Wochen nach dem Eingriff Xylenol-Orange erhalten. Der Zeitraum zwischen der Gabe der Fluorochrome beträgt also nur 6 Wochen. Vermutlich aus diesem Grund sind im ultravioletten Licht die entsprechend markierten Areale für Tetracyclin und Xylenol nur schwer zu unterscheiden, da mehr rötlich und gelblich fluoreszierende Bänder ohne Grenze ineinander übergehen. In der Kompakta findet sich ähnlich wie im Endost eine längere, dünne gelbe Bande. Nach einer Anlagerung mineralisierten Gewebes folgt nach außen eine breit aufgelagerte Tetracyclin speichernde Zone, die ein ausgedehntes periostales Knochenregenerat auf Höhe des Prüfkörpers darstellt. Im Gegensatz zum übrigen Knochen sind die fluoreszierenden Flächen hier sehr breit und zeigen ein wirbelartiges, unregelmäßiges Bild. Ähnlich breite Mineralisationszonen finden wir in unmittelbarem Kontakt zum Prüfkörper im Inneren der Markhöhle. Von der Außenkompakta kommend erkennt man mehrere fluoreszierende, gelbe Bänder, die im Bereich der Kompakta noch relativ scharf begrenzt sind und den Konturen von Knochenkanälen, kleineren Markhöhlen und Gefäßquerschnitten folgen. Dort, wo das zellreiche Knochenregenerat die Keramik berührt, finden sich teilweise auffallend breite Tetracyclinbänder, wobei eine Wachstumsrichtung nicht eindeutig zu erkennen ist (Abb. 8).

Zum Teil entwickelt sich die mineralisierte Substanz in die Richtung zur Markhöhle, erkennbar an kleinen Xylenol-Orange-haltige Inseln, zum Teil lagert sich das Regenerat direkt an der Keramikoberfläche an. Solch breite, gelb fluoreszierende Bänder finden sich auch an bogigen Resorptionslakunen in der Keramik. Hier fällt auf, daß die Lakunen offensichtlich von einem nicht fluorochromspeichernden Gewebe ausgefüllt sind; sehr dünne Farbstoffbänder dringen lediglich am Rande der Arrosionshöhle, der Keramik direkt anliegend, in die Lumina vor (Abb. 9).

In einem anderen Schnittpräparat ist genau die Knochenplatte getroffen, die sich an der Stirnseite des Keramikzylinder angelagert hat. Im Bereich der Kompakta sieht man eine Bruchkante, die auf anderen Schnitten auch vorhanden ist, jedoch als präparationsbedingtes Artefakt angesehen worden ist. Genau parallel zur Bruchlinie verlaufende orangefarbene Speicherherde deuten

jedoch an, daß hier eine vitale Reaktion stattgefunden hat. Vermutlich handelt es sich um eine Ermüdungsfraktur. Dies würde auch die breit periostale Knochenregeneration auf der Gegenseite (und auch das Kallusgewebe auf den lichtmikroskopisch untersuchten Präparaten) erklären.

Auf der Prüfkörperoberfläche (kreisrunde Stirnseite des Implantatzylinders) sieht man zellreiche Spongiosabälkchen, teilweise zwiebelschalartig mit Fluorochrombändern umgeben. Auch hier sind die Farbstoffanreicherungen sehr breit, ähnlich dem periostalen Knochenregenerat, während sich in der umliegenden Compakta bis auf die Bruchzone keine Markierungen finden (Abb. 10).

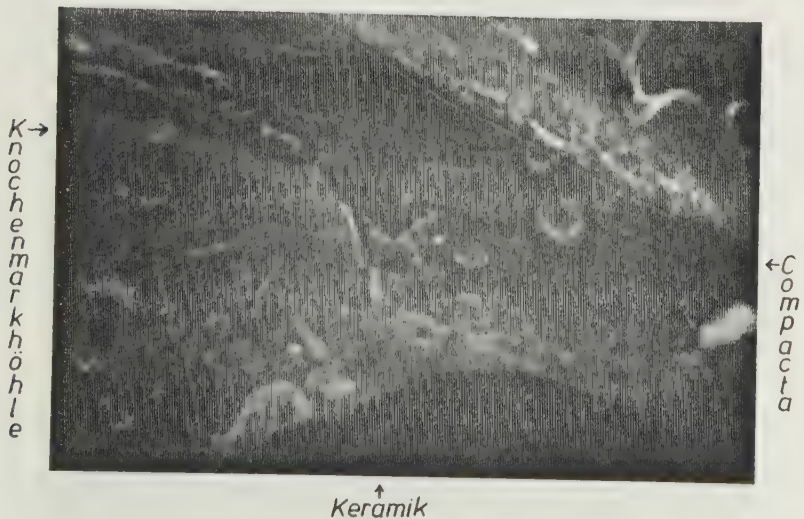


Abb. 8: Tier 0410, li Femur, Querschnitt des Prüfkörpers, Fluoreszenzaufnahme. Hier lassen sich periostale (oben rechts) und endostale (Mitte) mit Tetracyclin markierte, aufgelagerte Knochenregenerate erkennen. Der vom Endost ausgehende, neu gebildete Knochen befindet sich im unmittelbaren Kontakt zum TCP – Zylinder. Der Knochenmarkraum daneben (links) weist keine Fluoreszenz auf. Vergrößerung 25fach, unentkalktes 50 μ m Präparat, Fluoreszenz – Blauviolett – Anregung.

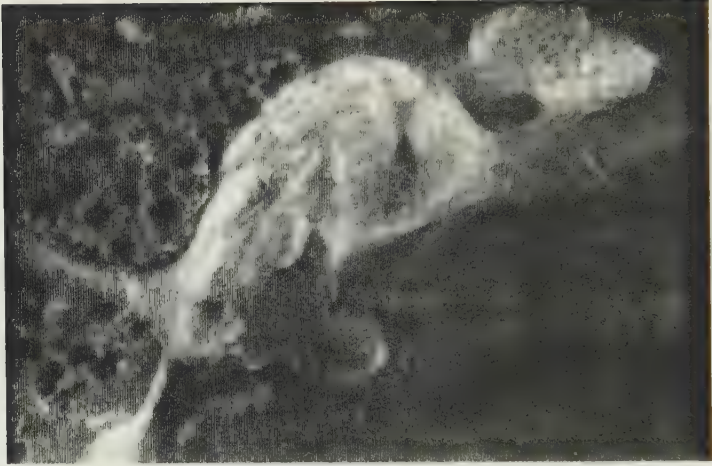


Abb. 9: Tier 0410, li Femur, Ausschnittvergrößerung von Abb. 8. Hier sind breite, mit Tetracyclin aufgelagerte Knochenregenerate zwischen Keramik (rechts unten) und Knochenmark (oben links) zu beobachten. Eine Resorptionshöhle an der Keramik mit sehr dünnen, fluoreszierenden Bändern am Rande der Arrosionshöhle ist zu erkennen. Kleine Xylenol-Orange-Inseln sind in Knochenmarksrichtung angeordnet. Vergrößerung 100fach.



Abb. 10: Tier 0410, li Femur, Längsschnitt, Fluoreszenzaufnahme. Eine aktive Knochenregeneration hat am Boden des Bohrdefektes, wo der TCP-Zylinder implantiert wurde (Halbkreis), stattgefunden. Die aus dem Periost ausgehenden Knochenregenerate (links) weisen breite tetracyclinaufgelagerte Zonen auf. Dagegen ist in der Compakta (rechts) keine Fluoreszenz zu erkennen, lediglich im Bereich der Frakturlinie (Pfeil oben rechts), die daher wohl kein operationsbedingtes Artefakt, sondern vermutlich eine intravitale Spontanfraktur darstellt. Vergrößerung 25fach, Fluoreszenz - Blauviolett - Anregung.

Tier 0401, linkes Femur

Lichtmikroskopie

In den ersten Schnittstufen ist der Prüfkörper mittig zwischen den beiden durchgehenden Kompaktalamellen zu erkennen. Gegenüber dem unauffälligen Knochenmark ist die Keramik durch dünne Knochenlamellen, die parallel zur Implantatoberfläche verlaufen, getrennt. Teilweise enthalten diese Knochenlamellen kleine Öffnungen, durch die die Zellen der Markräume in Kontakt zum Implantat treten können (Abb. 11).

Zahlreiche Osteozyten der dem Implantat anliegenden Knochenlamellen scheinen – zumindest mit ihren Ausläufern – oft auch mit dem Zellkörper unmittelbaren Kontakt zur Keramikoberfläche zu haben (Abb. 12).

Im Vergleich zu anderen Implantaten mit geringerer Liegedauer sind die Resorptionen an der Keramik nur gering ausgeprägt. In den ersten Schnittstufen erkennt man nur punktuelle Resorptionslakunen; auf der 8. Schnittstufe, wo die beiden kortikalen Begrenzungen der Markhöhle durch die Vorbohrung offensichtlich durchtrennt waren, hat sich neuer Lamellarknochen gebildet. Hier erreicht die oberflächliche Arrosion der Keramik etwa 1/3 der Circumferenz des Implantatkörpers. In den Resorptionslakunen, die wie bei den anderen Tieren oftmals Verbindung zu den Knochenkanälchen aufweisen, findet sich neben abgelösten Keramikpartikeln ein gleichartiges, resorptives Bindegewebe, dessen Zellkerne in der Methylenblau-Färbung sich nur wenig anfärben und eine spindelige und ovaläre Form besitzen. Gelegentlich sieht man größere, runde Zellen mit zirkulär angeordneten, tiefblauen Granula. Wie bei den Präparaten anderer Tiere auch ist abgelöste partikuläre Keramiksubstanz nur im Bereich der Resorptionslakunen in geringer Entfernung – im Allgemeinen in der Richtung eines Kanals – zu erkennen. In größerer Distanz zum Implantat bzw. in den eigentlichen Markräumen des Femurs kann man solches Material nicht ausmachen. Vereinzelt sind oberflächliche Arrosionsherde der Keramik mit Havers'schen Osteonen ausgefüllt, die mit ihrem Zentralkanal getroffen werden (Abb. 12).

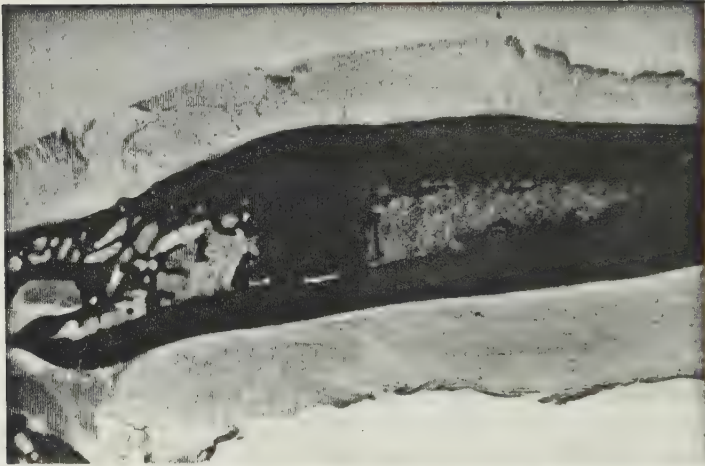


Abb. 11: Tier 0401, li Femur, Längsschnitt, Photographische Übersichtsaufnahme. Der Prüfkörper ist völlig im Knochen integriert und durch neu gebildete Knochenlamellen vom Knochenmark getrennt worden. Vergrößerung 8fach, Färbung: KOSSA, Methylenblau.

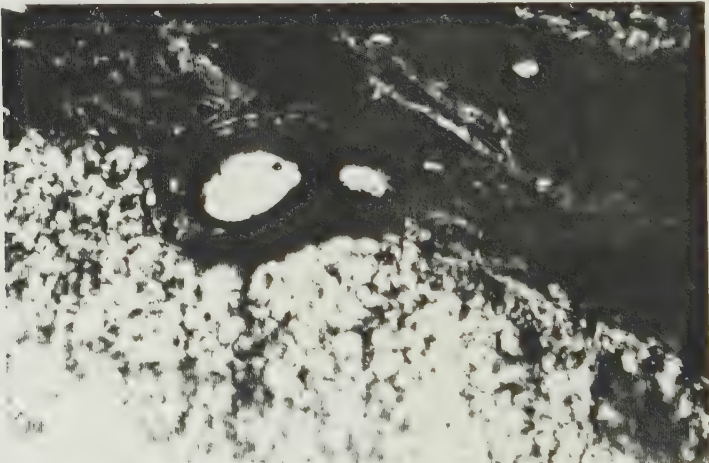


Abb. 12: Tier 0401, li Femur. Der neugebildete Knochen weist hier eine höhere Organisation auf. Ein Osteon hat sich in einer Arrosionshöhle der Keramik gebildet. Osteozyten werden in unmittelbarem Kontakt mit der Keramik beobachtet. Vergrößerung 320fach, Färbung: KOSSA, Toluidinblau.

Fluoreszenzmikroskopie

Das Tier 0401 hat entsprechend Markierungsplan 4 Wochen post op. Tetracyclin, anschließend in 4 – wöchigen Abständen Xylenol – Orange, Calcein – Blau und Alicarin – Complexon sowie eine zweite Gabe Tetracyclin erhalten.

Auf dem Schnittpräparat stellt sich im Wesentlichen die Tetracyclin – Markierung dar, die relativ gleichmäßig in der Compacta, der Spongiosa des Femurhalses und in dem Knochenregenerat um den Prüfkörper verteilt ist. Nur vereinzelt finden sich schlierenartige, verschwommene orangefarbene und rote Markierungen der anderen Fluoreszenzfarbstoffe. Anfärbungen mit Calcein – Blau sind nicht auszumachen.

Stärkere bandförmige Tetracyclin – Anreicherungen sehen wir in der Außencompacta, wo die Anfärbungen der Längsstruktur der Osteozyten folgen und vorwiegend der Periost – und etwas spärlicher der Endostseite zugewandt sind. Hier sieht man auch punktförmige, intensiv gelb gefärbte Farbstoffmarkierungen ganz umschrieben in einzelnen Osteozytenhöhlen. Ähnlich breite Gelbfärbungen wie in der Compacta sind in der periimplantären Spongiosa teils zum Endost, teils zur Keramikseite angeordnet (Abb. 13).

Die vereinzelt Resorptionlakunen in der Keramik zeigen keine Farbstoffansammlung im inneren Lumen, wohl aber in der Peripherie. An einer Arrosionshöhle läßt sich durch die Farbfolge der Fluoreszenzmarkierung die Wachstumsrichtung des Mineralisationsprozesses verfolgen. Von der Keramikoberfläche aus schreitet die Calziumeinlagerung offenbar zum Lumen der Resorptionshöhle fort (Abb. 14).

Insgesamt hat man bei diesem Präparat den Eindruck, daß die durch Fluorochrome aufgezeigten Regenerationsvorgänge relativ ruhig und ausgewogen ablaufen. Das Implantat befindet sich in einer Zone erhöhter Aktivität, wobei die Ursachen dafür vom morphologischen Bild nicht abzulesen sind.



Abb. 13: Tier 0401, li Femur, Fluoreszenzaufnahme. Eine hohe Aktivität des Periosts sowie des Endosts, erkennbar an der reichen Tetracyclin - Auflagerung hat stattgefunden. Knochenregenerate haben sich um den Prüfkörper herum (rechts) und in Knochenmarksrichtung (unten rechts) gebildet. Vergrößerung 25fach, Fluoreszenz - Blauviolett - Anregung



Abb. 14: Tier 0401, li Femur, Ausschnittvergrößerung von Abb. 13. Resorptionshöhle an der Keramikoberfläche, die mit einem nicht fluoreszierenden Gewebe ausgefüllt ist (Mitte). An ihrer Peripherie (Knochenseite) verfolgt man die Reihe der Markierungsfarbstoffe: Tetracyclin (breite Bänder, gelb), Xylenol - Orange (orange), Alizarin - Komplexon (rot) und Tetracyclin (Keramikhöhle innen, gelb). In der Compakta fallen zahlreiche Osteozytenhöhlen mit gelber Fluoreszenz auf. Vergrößerung 100fach.

Tier 0406, linkes und rechtes Femur

Die histologischen Befunde gleichen im Wesentlichen denen der anderen Tiere. Bei beiden Femora erscheinen die Zylinderimplantate im Längsschnitt allseits von Knochen umgeben, wobei man den Eindruck gewinnt, der Knochen bemüht sich, durch eine dünne lamelläre Schicht das Implantat von dem ansonsten unauffälligen Markraum zu separieren. An mehreren Stellen ist diese Knochenlamelle durch Kanälchen, die zum Markraum führen, unterbrochen.

Trotz der langen Liegezeit von 42 Wochen ist an beiden Extremitäten die Resorption der Keramik auffallend gering; lediglich in wenigen umschriebenen Bezirken finden sich Oberflächenarrosionen und Resorptionsnester im Innern der Keramik. Die kleinen punktförmigen Orte der Resorption sind häufig mit Knochenkanälchen vergesellschaftet, in denen sich Fibroblasten, kleinste Kappillarsprossen und Histiozyten finden. Teilweise scheint die Resorption nach zwei Seiten abzulaufen: auf Keramikseite Strukturauflockerung und abbröckelnde Keramikörnchen; auf der Knochenseite bogiger Verlauf mit Resorptionsbuchten. Die Resorptionsrate scheint geringer zu sein als die der Tiere 0410, 0401 und 0402 (Abb. 15).

Am linken Femur hat das Implantat Kontakt mit dem Weichgewebe. Dort ist es von einer feinen, fibrösen Kapsel mit oberflächenparallelen Fasern umgeben. In der benachbarten Muskulatur ist keine Fremdkörperreaktion zu beobachten (Abb. 16) (von Tier 0406 wurden keine Schnitte für die Fluoreszenzmikroskopie angefertigt).

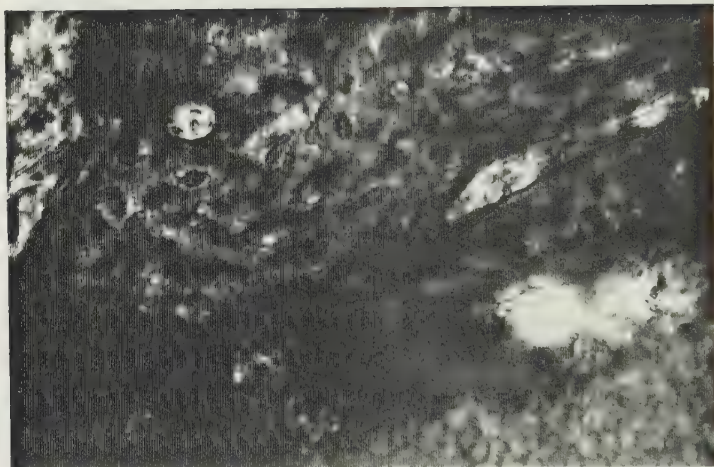


Abb. 15: Tier 0406, li Femur. Eine Resorptionslakune an der Keramikoberfläche (oben links), die mit einem Blutgefäß in dem umliegenden , neugebildeten Knochen vergesellschaftet ist. Vergrößerung 320fach, Färbung: KOSSA, Toluidinblau.

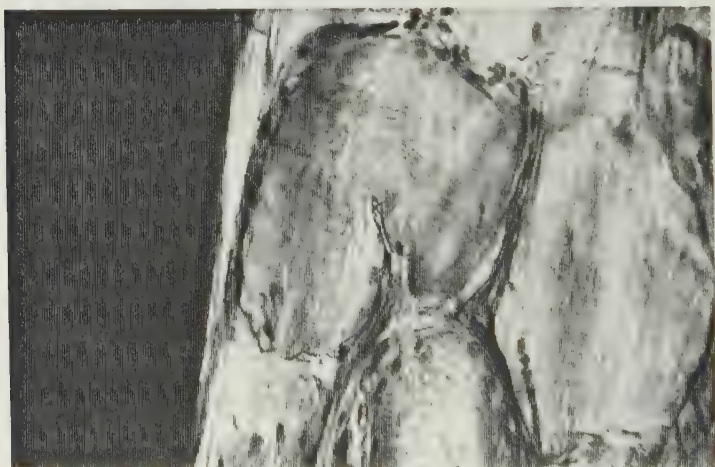


Abb. 16: Tier 0406, li Femur. An der Kontaktstelle Keramik - Muskulatur entstand keine Oberflächenarrosion. Die Keramik wird von einer faserigen Kapsel umgeben. Eine Fremdkörperreaktion ist nicht vorhanden. Vergrößerung 320fach, Färbung: KOSSA, Methylenblau.

Pseudarthrosenpräparate

Tiere 0402, linkes Femur (s. Tab. 12)

Der Femur ist offensichtlich im Bereich des Prüfkörpers frakturiert, wobei der Keramikzylinder in zwei Teile getrennt worden ist. Um den Bruch hat sich in einer Ausdehnung von über 1 cm eine Kallusspindel entwickelt. Die Längsachse des Knochens ist geknickt. Unter Verkürzung in der Länge hat sich das kaudale Fragment mit der Cortikalis an die kraniale Bruchfläche, die z.T. von der Keramik gebildet wird, angelegt.

Die Kallusspindel ist auf der konkaven Seite des Achsenwinkels deutlich dicker entwickelt als auf der konvexen. Vermutlich durch ständige Bewegung ist die Cortikalis des distalen Fragments pfannenartig ausgehöhlt worden, wobei sich am proximalen Femurstumpf durch Abrundung ein neuer Gelenkkopf gebildet hat, bestehend aus der wandständigen Cortikalis, die sich durch Knochenregenerate verdickt hat, und einen Anteil der offensichtlich im Knochen fest verankerten Calciumphosphatkeramik. Nachdem Gelenkkopf, Gelenkpfanne und Gelenkspalt deutlich abzugrenzen sind, können wir von einer Pseudoarthrose am Implantationsort sprechen.

In dem faser- und zellreichen Kallusgewebe, das die Pseudoarthrose wie eine Manschette umgibt, läßt sich neben reichlicher Grundsubstanz und Knorpelgewebe auch neuer Geflechtknochen entdecken, der als Auflagerung an der Femurcortikalis überwiegend auf der konkaven Seite in Erscheinung tritt. Dagegen herrschen auf der gegenüberliegenden, konvexen Seite resorptive Vorgänge vor. Keramikkörper finden wir in beiden Fragmenten offensichtlich fest eingeeilt (Abb. 17).

Die von Knochen umgebenen Seiten der Keramik zeigen tiefe Resorptionslakunen. Dagegen ist der dem Gelenkspalt zugewandte Rand des Keramikkörpers im kranialen Fragment fast glatt und korrespondiert gut mit der ange deuteten Pfannenform in der gegenüberliegenden Cortikalis. Hier sehen wir ebenfalls eine glattrandig verlaufene Begrenzungslinie, wobei aber zahlreiche schräg gerichtete Havers'sche Kanäle angeschnitten sind. Der Knochen scheint vital zu sein, die Osteozytenhöhlen sind mit Zellen gefüllt. Vom Rande her schiebt sich Kallusgewebe langsam in den Falschgelenkspalt vor, wo es in kleinen Resorptionslakunen des Knochens zu erkennen ist.

Der proximale enossale Keramikanteil zeigt in der Kontaktzone mit der Kompakta tiefere Resorptionsbuchten, an denen partikuläre Keramiksubstanz offensichtlich freigesetzt und in einen Havers'schen Kanal entleert wird. Ein solcher Gang läßt sich bis in einen angrenzenden Markraum verfolgen, wo ebenfalls Keramikpartikel zu sehen sind. In den von der Keramik weiter entfernten Markräumen, die dann großmaschiger werden, tauchen nur noch ganz vereinzelt Keramikgranula auf.

Nirgends lassen sich mit diesem Material besondere zelluläre Reaktionen in Zusammenhang bringen; es finden sich lediglich zirkulär granulierte Histiozyten. Ansonsten scheint das Knochenmark normale Zellen aufzuweisen.



Abb. 17: Tier 0402 li Femur, photographische Übersichtsaufnahme; das proximale (links) und das distale (rechts) Femurfragment mit gut verwachsenen TCP – Resten an ihrem Bruchende sind hier dargestellt. Eine Art Pseudarthrose mit Gelenkkopf (proximales Fragment), Gelenkpfanne an der kaudalen Kortikalis des distalen Fragments und Gelenkspalt hat sich gebildet, wobei an der konkaven und der konvexen Seite Knorpelgewebe zu erkennen ist, das zur Überbrückung beider Fragmente führt. Vergrößerung 8fach, Färbung KOSSA, Toluidinblau.

Pseudarthrosenpräparate mit Prüfkörper innerhalb der Pseudarthrose

Lichtmikroskopie

Tiere 0401 (re. Femur), 0403 (li. Femur), 0405 (li. Femur) 0407 (li. Femur), 0408 (li. Femur), 0409 (li Femur).

Bei diesen Präparaten finden sich im wesentlichen gleichartig die Prüfkörper mehr oder weniger zentral im Spalt der Pseudarthrose, die offensichtlich nach der Spontanfraktur im Bohrungsbereich auf Höhe des Trochanter major eingetreten ist. Manchmal steht der Implantatzylinder mit seiner Längsrichtung zwischen den Fragmenten, die er wie ein Sperrknochen trennt (Abb. 18 u. 19). Die Stirnseiten der Prüfkörper erscheinen leicht abgerundet; die scharfen Ecken, die hier normalerweise von der Herstellung her zu beobachten sind, sind abgetragen. Dementsprechend hat sich in den Femurstümpfen eine neue Gelenkpfanne ausgebildet. Während diese Gelenkpfanne am distalen Femurfragment prüfkörperseitig durch zahlreiche Resorptionslakunen gekennzeichnet ist, wird die Gelenkpfanne am kranialen Fragment durch neugebildeten geflechtartigen Knochen gebildet, der in Richtung Prüfkörper heranwächst. Damit scheint der Abbau in der kaudalen Gelenkpfanne zu korrespondieren, wobei der knöcherne Abschluß der Femurmarkhöhle durch entsprechenden lamellären Knochenanbau von kaudal her erhalten bleibt. Bis auf die beschriebene Abrundung des Prüfkörpers an seiner Stirnfläche, die vermutlich durch mechanischen Abrieb verursacht worden ist, finden sich an den Prüfkörpern kaum Substanzabtragungen. Die Prüfkörper sind im Kallusgewebe eingebettet; das den ganzen Pseudarthrosenbereich ausfüllt und überbrückt. In der Nähe der Keramik sieht man zumeist zelluläre Grundsubstanz, erst in weiterer Entfernung sind die typischen Ansammlungen von Knochenzellen erkennbar. Teilweise grenzt aber auch direkt an das Implantat aus dem Kallus neugebildeter und noch gering mineralisierter, zellreicher Geflechtknochen bzw. Osteoid. Tiefergehende Resorptionen der Keramik fallen in Kontakt mit diesem Gewebe nicht auf.

In den Fasergeweben der Kallusspindel sieht man mehrfach partikuläre Keramiksubstanz eingestreut, die in den Septen zwischen größeren Faserzügen lokalisiert ist. Keramikspuren finden sich auch in den Knochenmarksräumen,

die ansonsten ein unauffälliges, blutbildendes Mark aufweisen. Die Markräume sind vom Pseudarthrosenbereich durch Knochenlamellen bzw. neuem Geflechtknochen getrennt, wobei die Barriere durch zahlreiche Kanälchen durchbrochen ist.

An der Außencompakta ist eine Auflagerung von Geflechtknochen eingetreten, die zur Kallusspindel überleitet, und auf Höhe der Pseudarthrosenspalte endet. (Abb. 18, 19)

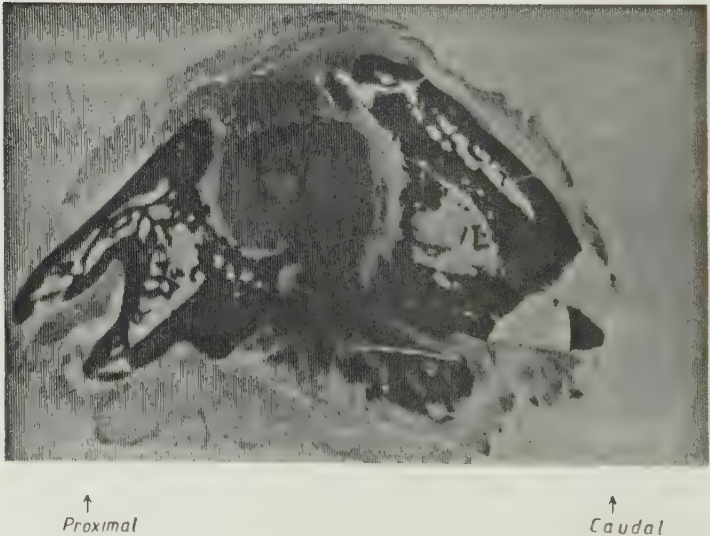


Abb. 18: Tier 0401, II Femur, photographische Übersichtsaufnahme, Vergrößerung 8fach, Färbung KOSSA, Methylenblau, Toluidinblau (Beschriftung siehe Abb. 19).



Abb. 19: Tier 0405, li Femur, photographische Übersichtsaufnahme. Der leicht abgerundete TCP – Zylinder liegt zwischen dem proximalen (links) und dem caudalen (rechts) Femurfragment. Am proximalen Bruchende ist neugebildeter, geflechtartiger Knochen zu erkennen, wobei am caudalen Fragmentstumpf Resorptionsvorgänge überwiegen. Kallusgewebe, das bis zum Prüfkörper herangewachsen ist, hat sich in der konkaven (überwiegend) sowie in der konvexen Seite gebildet. Vergrößerung 8fach, Färbung: KOSSA, Methylenblau, Toluidinblau.

Fluoreszenzmikroskopie

Tier 0401 rechtes Femur

Das Präparat zeigt einen längs getroffenen Prüfkörper, umgeben von wirbelartigen Bindegewebszügen. Die Stirnfläche des Implantatkörpers ragt in Richtung Markhöhle des kranial und kaudal anschließenden Femurknochens. Die kraniale und kaudale Markhöhle sind zum Prüfkörper durch weiter verzweigten geflechtartigen Knochen abgedeckt, der zur Stirnfläche des Prüfkörpers eine Art unregelmäßig begrenzte Gelenkpfanne bildet. In der kaudale Gelenkpfanne fallen insgesamt wenige und schmalere Fluorochromanreicherungen (gelb, rot und orange) auf im Vergleich zur kranialen Gelenkpfanne, wo wir neben wenigen orangefarbenen und roten Tönen überwiegend gelbe Markierungen beobachten. Die Wachstumsrichtung der Mineralisationsprozesse im kranialen Pseudarthrosenbereich scheinen auf den Prüfkörper gerichtet zu sein, während sie in der kaudalen Gelenkpfanne mehr in Richtung Endost und Knochenmarkhöhle weisen.

Auf der Prüfkörperseite sieht man auch zahlreiche buchtenförmige Begrenzungen, in denen kaum eine Fluorochromaktivität erkennbar ist. Teilweise erkennt man hier quergetroffene Bindegewebsbündel der Kallusspindeln, die durch ihre eigene Fluoreszenz auffallen. Zahlreiche Markierungslinien treffen senkrecht auf die prüfkörperseitige Begrenzungsflächen der kaudalen Gelenkpfanne. Dies deutet darauf hin, dass es sich um ältere Knochenmarkierungen handelt, wobei mineralisierte Substanz schon wieder abgebaut wird. Solche senkrecht auf der Pseudarthrosefläche endenden Fluorochromlinien finden sich dagegen auf der kranialen Seite kaum. Hier verlaufen sie zumeist oberflächenparallel, nur vereinzelt von einem Knochenkanal unterbrochen. In der Kallusspindel finden sich mehrere Absprengungen vom Prüfkörper, die mit gelben Fluoreszenzmarkierungen vergesellschaftet sind, aber auch avitale Knochensplitterchen ohne Zeichen des Umbaus.

Der Keramikkörper erscheint an seinen Kanten abgerundet, sowie in seiner Mitte leicht sanduhrförmig abgeschnürt. Die Keramikstruktur ist bis auf einen artefiziellen Sprung völlig homogen.

Tier 0403 linkes Femur

Der Prüfkörper ist quer geschnitten, die Oberfläche unauffällig und die Kornstruktur gleichmäßig. Der Prüfkörper liegt in einer Pseudarthrose, wobei im proximalen Cortikalisfragment der scharfrandige Bohrdefekt erhalten geblieben ist.

Zur Markhöhle des proximalen Fragmentes schließen sich Knochenareale an, die aus relativ schmalen orangefarbenen und manchmal breiteren gelben Bändern bestehen, und zur relativ weitmaschigen Spongiosa des Femurhalses überleiten. Im kaudalen Knochenstumpf der Pseudarthrose sehen wir ein buntes Bild von wechselnd orangefarbenen und gelben Bändern, die eine lebhaftere Regeneration von Geflechtknochen widerspiegeln.

Tier 0407 linkes Femur

Devitale Knochenpartikel und Knochenregenerate, die vom Periost ausgehen, sind zu beobachten. Der Femurkopf ist angeschnitten mit dem Femurhals. Dann folgt eine Kallusspindel und ein zweites Cortikalisfragment. In diesem zweiten Fragment scheinen die Umbauvorgänge, die sich an den Tetracyclinmarkierungen erkennen lassen, stärker ausgeprägt zu sein als im proximalen Fragment, bei dem die Hauptaktivität subperiostal in dem Bereich der oben beschriebenen devitalen Knochensplitter zu liegen scheint.

Tier 0408 linkes Femur

Auf dem Präparat ist ein Femurschnitt enthalten, der nach kranial eine kreisrunde, der Prüfkörperoberfläche genau entsprechenden, Ausstanzung besitzt. Auf etwa halber Höhe des Prüfkörpers endet die cortikale Kontinuität, wobei die Kanten gerundet sind. Die angeschnittene Cortikalisröhre zeigt nur an wenigen Stellen in den Havers'schen Kanälen eine Fluorochromaktivität (orange). Im Bereich der Ausstanzung finden sich keine Anreicherungen außer in der Cortikalisaußenschicht, wo ein dichtes Regenerat von Geflechtknochen sich vom Periost kommend der Compakta aufgelagert hat. Dadurch ist der Compactaknochen zum Implantat hin deutlich verdickt. Im Regeneratknochen lassen sich im Gegensatz zum Endost gelbe und orange Farblinien

unterscheiden. In der ehemaligen Bruchzone sieht man keine Fluorochromaktivität, wohl aber in der anschließenden subperiostalen Ablagerung von Geflechtknochen, die in zahlreichen Havers'schen Kanälen gelbe und orange Farben erkennen läßt.

Nach einem Interponat vom Kallusgewebe, das sich in den ungefärbten Schnitten bzw. in der Fluoreszenzfärbung nicht genau differenzieren läßt, folgt der proximale Anteil des Pseudarthrosenstumpfes. In dem Kallusgewebe fallen vereinzelte Knochensplitter auf, die in der Fluoreszenz unauffällig sind. Der proximale Pseudarthrosenstumpf zeigt unregelmäßig ausgebuchtete, mit dem Prüfkörper korrespondierende Gelenkpfannen, wobei der Pseudarthrosenspalz ein faserreiches Bindegewebe und zahlreiche abgesplitterte Keramikpartikel enthält.

Das Bindegewebe des Pseudarthrosenpaltes leitet über zu gelb und orange markierter mineralisierter Knochensubstanz, wobei die breiten Farbbänder dem angeordneten Verlauf der Havers'schen Kanäle folgen. Etwa im Abstand von 1 mm von dieser unruhigen Zone des regenerierenden Geflechtknochens finden sich zahlreiche Havers'sche Osteone mit lamellärem Knochen und zwiebel-schalenartigen Markierungsrandern. Insgesamt scheint im proximalen Femurabschnitt die Tetracyclinmarkierung zu überwiegen.

Der Prüfkörper zeigt eine homogene Kornstruktur. Die Oberflächenbegrenzung ist geringfügig an manchen Stellen aufgeraut, wobei man den Eindruck eines mechanischen Abriebs hat.

Tier 0409 linkes Femur

In UV-Licht zeigt der Kompaktaknochen nur dünne gleichmäßig verteilte Tetracyclinlinien, die teils im Endost, teils subperiostal und zum Teil in den Havers'schen Kanälen liegen. Auf der dem Prüfkörper zugewandten Seite der Kompakta, fällt die subperiostale Knochenregeneration stärker auf. Entlang einem Knochengefäß verläuft hier eine deutliche subperiostale Regenerationszone mit einem Band aus lamellärem neuen Knochen.

Der Prüfkörper ist von oberflächenparallelen Bindegewebsfasern umgeben ohne Anzeichen von Resorption. Die Kornstruktur des Prüfkörpers ist homogen und unauffällig.

Präparate mit Prüfkörpern in der Muskulatur

Tiere 0402 (re Femur), 0403 (re Femur), 0404 (li, re Femur), 0405 (re Femur), 0408 (re Femur), 0409 (re Femur), 0410 (re Femur)

In den Fällen, in denen sich der Prüfkörper in der Muskulatur befindet, zeigt das histologische Bild eine bindegewebige Abkapselung des Zylinders. Es wird von oberflächenparallelen mäßig zell- und faserreichen Bindegewebszügen umgeben. Daneben finden sich zahlreiche Kapillare, gelegentlich granulierte Histiozyten. Eine Fremdkörperreaktion ist nicht nachzuweisen. Die sich daran anschließende quergestreifte Muskulatur bietet ein unauffälliges Bild ohne Zeichen von Degeneration. Die Keramikoberfläche erscheint glatt. Eine Auflösung des Prüfkörpers ist nicht zu beobachten.

Bei Tier 0402 re Femur ist in der Nachbarschaft des TCP-Implantates eine derbe abgekapselte Geschwulst (Durchmesser ca. 5 mm) entstanden. Die Schnittfläche des Knotens zeigt vertikales faseriges Gewebe. Bei der histologischen Untersuchung wurde festgestellt, daß es sich um ein Fibrom handelt (Abb. 20).

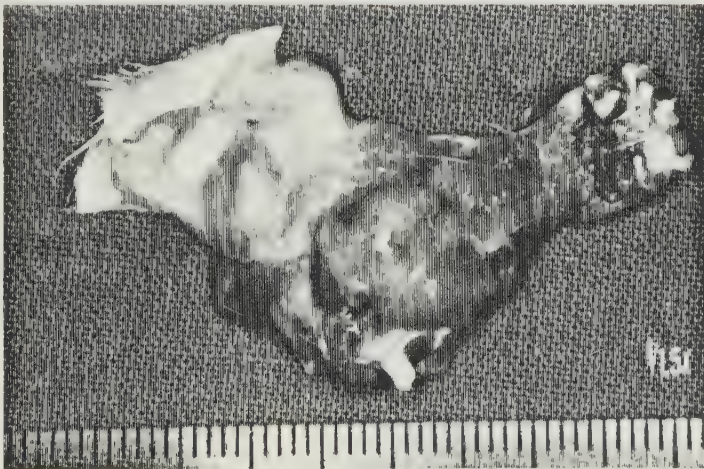


Abb. 20: Tier 0402, re Femur, Übersichtsaufnahme. Der TCP-Zylinder schimmert oben links unter dem angeschnittenen Fell weißlich durch; rechts daneben hat sich ein derbes Fibrom entwickelt.

4.7. Mikroradiographie

Tier 0406 rechtes und linkes Femur

Auf den Übersichtsaufnahmen von 50 μm starken in Acrylat eingebetteten Knochenschnitten sieht man normale Begrenzungslinien des Femurpräparates mit Gelenkkopf, Femurhals, und schmaler Wachstumsfuge (Abb. 21). Während im Femurkopf eine feinwabige Spongiosa auffällt, ist die Bälkchenstruktur der Spongiosa im Halsbereich grobwabig, wobei die Knochenbälkchen sich von der randständigen Cortikalis als Basis hier entwickelt haben könnten. Zur Diaphyse hin fehlen die Trabekel, erst im distalen Condylus treten sie in dichter Anordnung um die schmale Wachstumsfuge in Erscheinung.

Der Implantatkörper ist quer getroffen, so daß ein runder oder ovaler Querschnitt resultieren müßte. Die hier erkennbare Form ist etwas eiförmig entrundet. Ansonsten erscheint das Keramikmaterial ganz homogen und noch weniger strahlendurchlässig als die benachbarte Compakta.

Der Keramikkörper liegt mittig zwischen den kortikalen Außenlamellen. Von der umliegenden Spongiosa ausgehend, kriechen dünne Knochenfäden an der Oberfläche des Implantatkörpers entlang, so daß diese durch eine dünne Knochenlage von der kranial und kaudal offenen Markhöhle fast vollständig abgetrennt ist. Ähnliche Knochenlamellen, die von der einen Außencortikalis zur anderen den Markraum vollständig überbrücken, sind sonst nicht zu beobachten (Abb. 21).

Bei stärkerer Vergrößerung erkennt man in der Compakta längs verlaufende, zum Teil aufzweigende Havers'sche Kanäle und etwas verschwommen Osteozytenhöhlen.

Die Keramik zeigt überwiegend eine glatte Begrenzungslinie, nur an einer der Compakta zugewandten Stelle, wo zungenförmig auslaufende Spongiosabälkchen am Implantat entlangwandern, finden sich deutliche Resorptionslakunen. Sie liegen unmittelbar an der Oberfläche, oder auch in geringer Tiefe darunter. In der Peripherie der Resorptionsbuchten von außen kommend, ist hier auch strahlendichteres Gewebe nachweisbar, das im Lumen der Resorptionshöhle selbst nicht erkennbar ist (Abb. 22).

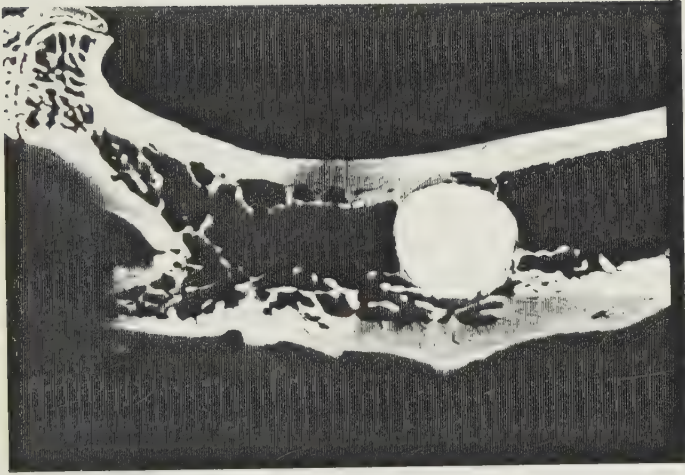


Abb. 21: Tier 0406, re Femur, mikroradiographisches Bild. Der Prüfkörper ist quer geschnitten. Er liegt zwischen den beiden Compaktalamellen und ist von neu gebildeten Knochentrabekeln umgeben. Kleine Arrosionen an der Oberfläche der Keramik sind zu erkennen (oben). Vergrößerung 8fach.

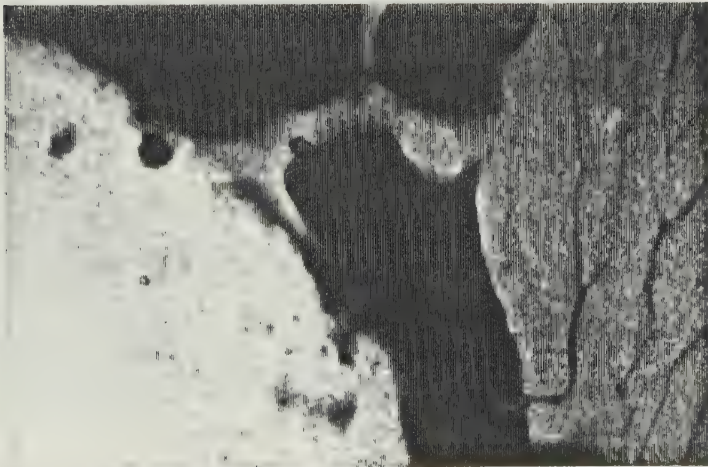


Abb. 22: Tier 0406, Ausschnittvergrößerung von Abb. 21 (seitenverkehrt). Von der den TCP-Zylinder umgebenden Spongiosa ist ein Knochentrabekel in Richtung Implantat gewachsen und mit ihm in Kontakt getreten, wobei kleine Resorptionen der Keramik sowohl an der Oberfläche des Implantates als auch im Inneren stattgefunden haben. Vergrößerung 100fach.

Tier 0405 linkes Femur (Pseudarthrose)

Das Schnittpräparat liegt auf Höhe des Keramik-Prüfkörpers, der in seiner Längsachse geschnitten ist (Abb. 23). Der umgebende Femurknochen findet sich erst in einer gewissen Distanz von der Keramik, wobei die Kontinuität des Femurs am Boden des Bohrdefektes unterbrochen ist. Offensichtlich handelt es sich um eine Pseudarthrose, wobei der Prüfkörper die Fragmente am innigen Kontakt hindert.

Die Außenkompakta erscheint glatt begrenzt und von normaler Stärke; sie umschließt einen Markraum, der zum Implantat durch eine kompakte Knochenlamelle verschlossen ist. Die Spongiosa – Bälkchenstruktur in den Markräumen erscheint unauffällig. Der ehemalige Bruchbereich ist weitgehend abgerundet. Der Prüfkörper besitzt eine strahlendichtere Konsistenz als der Knochen. Die scharf abgrenzende Begrenzung der Keramik entspricht wohl der ursprünglichen Form des Körpers, bis auf eine flache Eindellung am kranialen Rand, die vermutlich mechanisch durch Abrieb an der gegenüberliegenden Kompakta entstanden sein dürfte (Abb. 23).

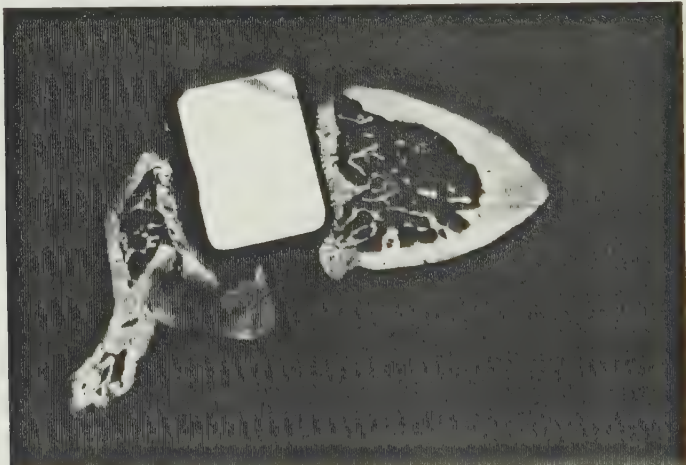


Abb. 23: Tier 0405 li Femur, Mikroradiographisches Bild, Erläuterung siehe Text.
Vergrößerung 8fach

5. Untersuchungen mit dem Rasterelektronenmikroskop (REM) *

5.1. Untersuchungstechnik und Untersuchungsmaterial (s. Tab. 15)

Zur Untersuchung stand ein Rasterelektronenmikroskop der Firma JEOL (JSM-35 CF) zur Verfügung. Als photographische Dokumentationseinheit war eine Kamera (MAMIYA, 6x7 cm Filmformat) in das Gerät integriert.

Man hat die zu Beginn beschriebenen TCP-Zylinder sofort nach der Herstellung und nach der Beschickung mit Gentamicin untersucht (Tab. 15). Außerdem hat man den Effekt eines Triglycerid-Zusatzes auf den Gentamicin-haltigen Prüfkörper studiert, um von der morphologischen Seite die Frage eines verbesserten Retardationseffektes für die Gentamicinfreisetzung abzuklären. Außerdem bot sich die Gelegenheit, ein Gentamicin- und Triglycerid-haltiges Präparat nach 10 Wochen Liegezeit im Rattenfemur zu beobachten. Jeweils ist die Oberfläche und die Bruchfläche im Innern des Prüfkörpers betrachtet worden. Nachdem diese Präparate auf einen Objektträger aufgeklebt worden sind, hat man sie mit Gold bedampft. Außerdem haben wir die Bruchflächen von Prüfkörpern studiert, die im Rattenfemur implantiert waren. Sie wurden in 10%igem Formalin fixiert und in der aufsteigenden Alkoholreihe (50%iges Äthanol 30 min, 2x 70%iges Äthanol 20 min, 2x 80%iges 20 min, 96%iges 12 h, 100%iges 15 min) entwässert. Nach der critical-point-Trocknung (Gerät CPD-020) konnte das Präparat mit Gold bedampft und im Mikroskop untersucht werden.

Tab. 15 *Untersuchungsplan*

Präparat	Material	Modifikation	Implantationsdauer (Rattenfemora)
1	β -TCP (Poros. Vol. 22%)	rein	—
2	β -TCP (Poros. Vol. 22%)	mit Gentamicin	—
3	β -TCP (Poros. Vol. 22%)	mit Gentamicin und Triglycerid	10 Wochen

* Mein besonderer Dank an Fr. Weinhard u. Hrn. Grösse für ihre Hilfe bei den REM-Untersuchungen (Anstalt für mikroskop. Anatomie der Universität München, Vorstand Prof. Dr. rer. nat. Dr. med. U. Welsch).

5.2. Untersuchungsergebnisse mit dem REM

Nativer Prüfkörper TCP

Zwischen gentamicinhaltiger und gentamicinfreier Keramik ist im REM kein morphologischer Unterschied auszumachen. Bei der Gentamicinkeramik fallen lediglich an der Oberfläche der Granula dunkle, ca. $0,5\text{ }\mu\text{m}$ große aber auch noch kleinere Punkte auf, die unregelmäßig an den prominenteren Stellen verteilt sind (Abb. 25) Möglicherweise entsprechen sie Leckstellen in der Metaldampfschicht. An der intakten Oberfläche der Keramik erkennen wir die einzelnen Granula ($5 - 10\text{ }\mu\text{m}$ im Durchmesser), die beim Sinterungsprozeß durch Brücken miteinander verbunden sind. Auf diese Weise werden rundliche Poren von $1 - 10\text{ }\mu\text{m}$ Durchmesser gebildet, die wie ein Schwammwerk in die Tiefe führen. Die abgerundeten Granula tragen oft terrassenförmig erhabene, hexagonale Felderungen, die auf die zugrundeliegende Kristallstruktur hinweisen. In die Oberfläche eingeschmolzen finden sich teilweise vereinzelt oder gruppenweise stehende, fingerförmige Auflagerungen, deren Herkunft unbekannt ist. Vielleicht handelt es sich um Verunreinigungen oder Verbrennungsrückstände von der Sinterung. Im Bereich der Brücke zwischen den Granula bleiben trotz eines fest zusammenhängenden Gefüges die Korngrenzen erkennbar; teilweise kann man sie lediglich an einer zarten Einschnürung, zum Teil aber auch an einem klaffenden feinen Spalt identifizieren.

Auf der Anbruchfläche läßt sich die gentamicinfreie und die gentamicinhaltige Keramik bis auf die erwähnten kleinen dunklen Pünktchen nicht unterscheiden. Eine hexagonale Felderung ist nur selten aufzufinden. Das Querschnittbild wird von eröffneten Kanälchen, Lumina und angebrochenen Granulatflächen bzw. frakturierten intergranulären Brücken gebildet. An intergranulären Verbindungen lassen sich die Korngrenzen als feine Linien oder Spalten, die sich manchmal über mehrere Körner fortsetzen, erkennen. Oft stoßen sie in einem Winkel von ca. 120° aufeinander. Die Anbruchfläche zeigt, daß die an der Oberfläche sichtbaren Poren weit in die Tiefe führen, und daß das verzweigte Kanalsystem in allen Richtungen gleichmäßig miteinander in Verbindung steht (Abb. 24, 25).

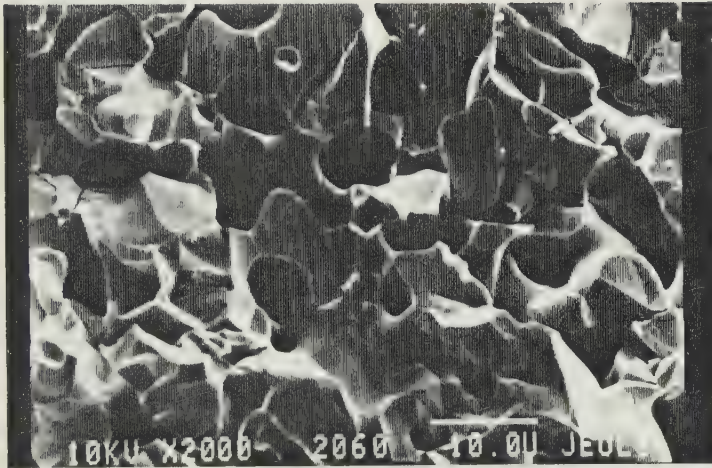


Abb 24: REM – Aufnahme, Vergrößerung 2000fach. Bruchfläche von einem nativen TCP – Prüfkörper ohne Zusatz von Gentamicin. Erläuterung siehe Text.

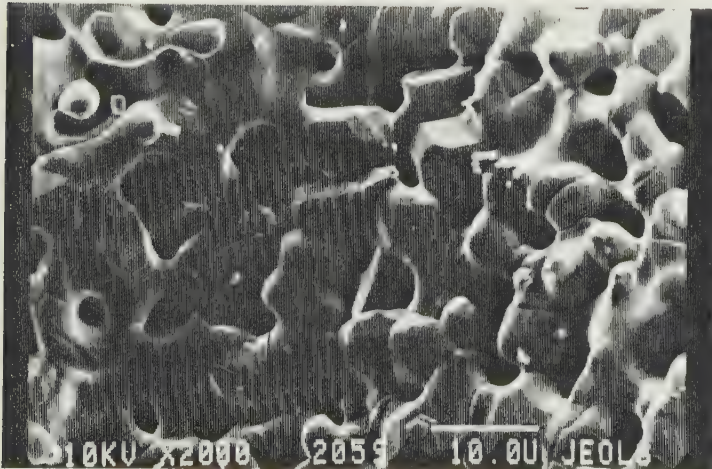


Abb 25: REM – Aufnahme, Vergrößerung 2000fach. Oberfläche von einem TCP – Zylinder ohne Zusatz von Gentamicin. Erläuterung siehe Text.

Nativer Prüfkörper TCP mit Triglycerid

An dem Präparat mit intakter Oberfläche ist Keramikmaterial nur noch schemenhaft mit Poren erkennbar, da es durch ein flockenartiges, fadenziehendes Material (vermutlich das Triglycerid) überdeckt ist (Abb. 26). Diese Substanz bildet aber keine homogen abdeckende Haut, sondern neben den einzelnen Flocken sind überall noch ca. 1 – 2 μm große Öffnungen vorhanden. Die Anbruchfläche läßt das fadenziehende Material als hautige Auskleidung der geöffneten Gänge und Kanäle erkennen (Abb. 27) Teilweise hängen fadenartige Fetzen an der Abbruchstelle in das Lumen hinein. An manchen Stellen verringert das Fettmaterial die lichte Weite der Kanäle nur geringfügig, an anderen Stellen sind die Gänge fast vollständig obturiert. Die Materialverteilung des Fettzusatzes erscheint beim Vergleich verschiedener Aufnahmen nicht ganz homogen.

Gentamicinhaltiges TCP – Fett – Drug – Depot nach 10 wöchiger Liegezeit im Rattenfemur

Die Anbruchfläche läßt allseits einen lückenlosen Verbund zwischen Keramik und dem Lagerknochen erkennen (Abb. 28). Die Hohlräume der Keramik sind ähnlich wie die nativen Präparate noch mit einer fetthaltigen Schicht in unregelmäßiger Weise manchmal spinnengewebeähnlich ausgekleidet. Am Knochen läßt sich der ursprüngliche Knochendefekt erkennen, der etwas größer (bis zu 80 μm) als der Prüfkörperdurchmesser ausgefallen ist. Dieser Spalt-raum ist mit einem feinmaschigen Geflechtwerk von spongiösem Knochen ausgefüllt (Abb. 29).

Teilweise grenzt an das Implantat auch cortikaler Knochen, in dem Osteozyten und Havers'sche Kanäle mit Aufzweigungen zu sehen sind. An manchen Stellen ist die Keramik – Oberfläche aufgelockert, wobei unterminierte Lichtungen unter der Oberfläche liegen (Abb. 30). Im Inneren der Keramik ist kein Knochengewebe zu entdecken, der Triglyceridzusatz scheint auch nach 10 Wochen Implantationsdauer erhalten zu sein (Abb. 31).

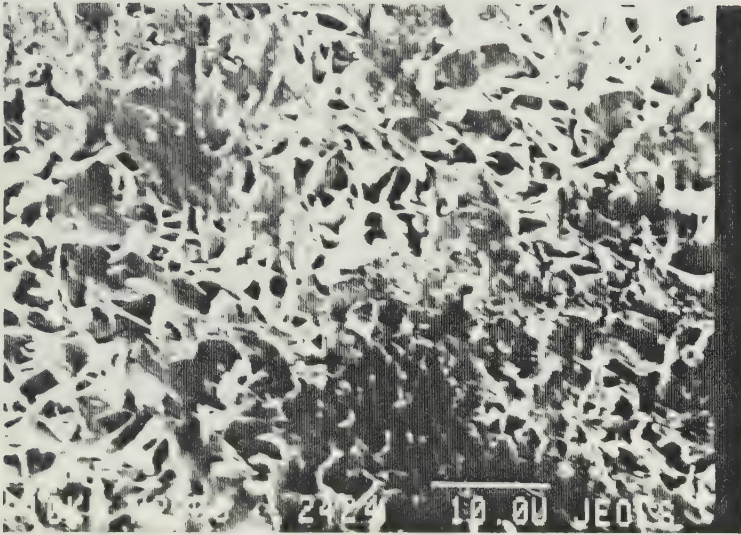


Abb. 26: REM - Aufnahme, Vergrößerung 2000fach. Oberfläche eines nativen Prüfkörpers mit Triglycerid. (s. Text)

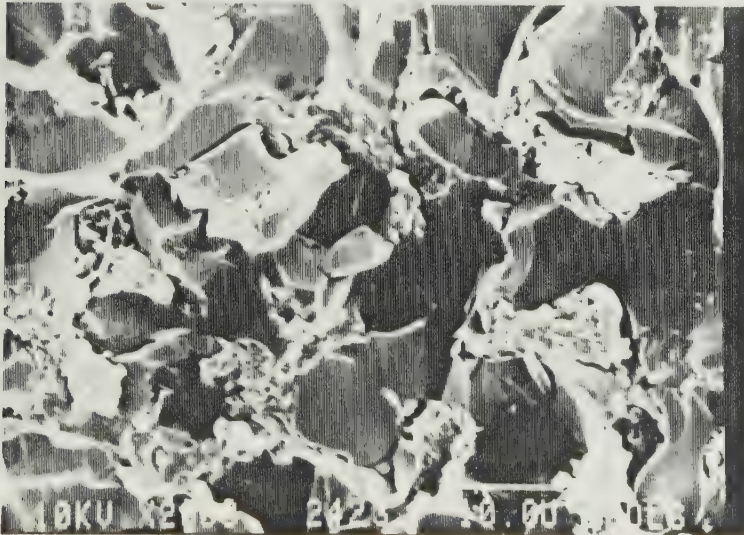


Abb. 27: REM - Aufnahme, Vergrößerung 2000fach. Bruchfläche eines nativen TCP - Zylinders mit Triglycerid. (s. Text)

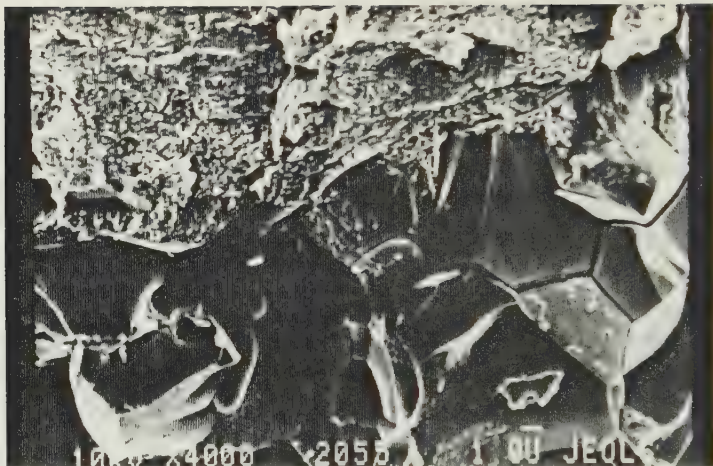


Abb. 28: REM – Aufnahme, Vergrößerung 4000fach. Unmittelbarer Kontakt zwischen Knochen (oben) und TCP (mit Gentamicin und Triglycerid) in der unteren Bildhälfte.

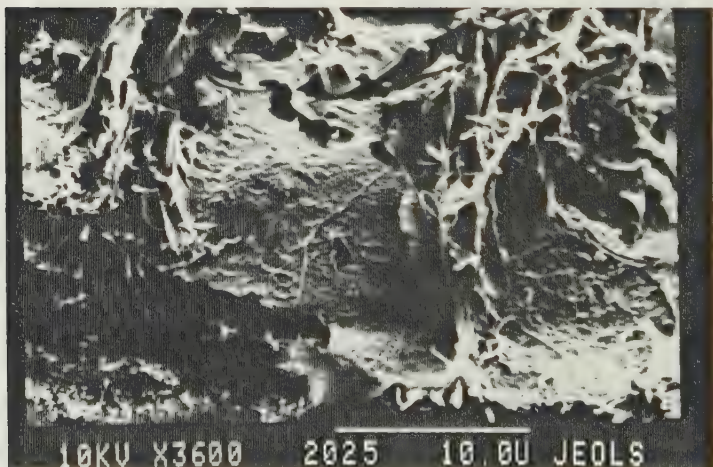


Abb. 29: REM – Aufnahme, Vergrößerung 3600fach. Zwischen altem Knochen (Ecke unten li) und Keramik (oben re) hat sich ein Geflechtwerk von spongiösem Knochen gebildet (Mitte).



Abb 30: REM-Aufnahme von implantierter TCP-Keramik mit Gentamicin- und Triglycerid-Zusatz, Vergrößerung 940fach. Die Keramik (unten und links) ist aufgelockert, erkennbar an dem Verlust ihrer Struktur. Einzelne Keramikkörner sind vom Knochen umwachsen. Im Knochen daneben (oben u. rechts) sind Blutkanäle und Osteozytenlakunen zu sehen.

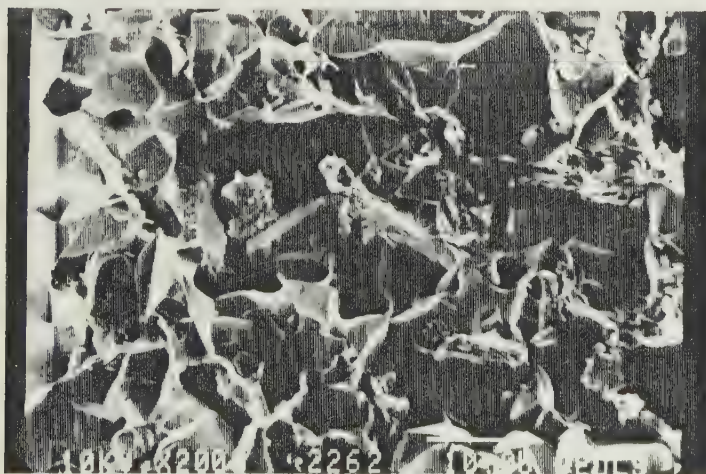


Abb 31: REM-Aufnahme von einem implantierten TCP-Zylinder mit Gentamicin- und Triglycerid-Zusatz, Vergrößerung 2000fach. Anbruchfläche der Keramik. Die Struktur ist der Bruchfläche eines nativen TCP-Zylinders ähnlich. In den Keramikporen ist kein Knochen- oder Weichgewebe zu erkennen, lediglich das vor der Implantation zugefügte Triglycerid.

6. Diskussion

Wichtigstes Ergebnis der Freisetzungsstudie ist, daß aus einem β -TCP-Trägerkörper etwa 75% des Gentamicinsulphates bereits am ersten Tage im Urin nachweisbar sind. Wie Ausscheidungsuntersuchungen anhand einfacher intramuskulärer Gentamicin-Injektionen an der Ratte gezeigt haben (ALEX 1985, Persönliche Mitteilung), ist im Vergleich zur intramuskulären Injektion ein gewisser Depoteffekt gegeben, da auch nach 14 Tagen Gentamicinspuren im Harn nachweisbar sind. Dennoch erscheint aufgrund klinischer Erfahrungen (KLEMM 1976, WAHLIG 1972) eine möglichst kontinuierliche Abgabe von Gentamicin über etwa eine Woche wünschenswert. Erst nach dieser Phase sind die Wunden geschlossen und Hämatome werden resorbiert bzw. durch Granulationsgewebe organisiert. Aus diesem Grunde erscheinen uns Verbesserungen des Drug-Depots notwendig, um einen stärkeren Retardeffekt in der Gentamicinabgabe zu erzielen. Aus der Pharmazeutik (ANDERSON 1981, s. S. 17) sind verschiedene Entwicklungsansätze bekannt, um diesem Ziel näherzukommen. Ein Wechsel der Trägersubstanz, z.B. auf Silicon (ANDERSON 1981) hätte zwar eine verzögerte Gentamicinabgabe zur Folge, ansonsten würde das Präparat die bereits genannten Nachteile der Gentamicin PMMA-Kugeln (Septopal^R) aufweisen. Aus Gründen der Biokompatibilität, besonders gegenüber Knochen, und auch wegen der Forderung nach Biodegradierbarkeit, wird man sich auf das untersuchte TCP, oder das von anderen Untersuchern inaugurierte Kollagen (STEMBERGER et al. 1983, GÖTZ et al 1981, JOOS 1985) bzw. Prolamin (SCHULTHEISS et al., 1981) eventuell auch andere biologisch abbaufähige Polymere (GRAHAM 1982, THIES 1981, FANKHAUSER 1982) beschränken müssen. STEMBERGER u. Mit. (1983) haben über Ausscheidungsraten einer Gentamicin-Kollagen-Kombination (Genta-Koll^R) am Kaninchen berichtet. Sie erzielten eine zufriedenstellende Kinetik mit einer hohen Gentamicinabgabe über eine Woche. In Kompakta und Knochenmark war Gentamicin noch bis zum 28. postoperativen Tag nachweisbar.

EITENMÜLLER u. Coautoren (1983) haben ein ähnliches Trägermaterial wie in unserer Untersuchung zur Kombination mit Polyvinylpyrrolidon-Jod-Komplex oder Fosfomycin oder Flucloxacillin bei Hunden eingesetzt. Der zeitliche Verlauf der Antibiotikumbabgabe war nicht zufriedenstellend, so daß die Autoren

die Prüfkörper mit PVP-Jod in einem Dragierverfahren mit Ethocel (Ethyläther oder Zellulose) und Dynasan 118 (Stearinsäure-Triglycerid) ummantelt haben. Dadurch konnte man die Antibiotikumbgabe auf eine Zeit von 6 Wochen hinauszögern (EITENMÜLLER, 1984). Von THOMA und ALEX (1984, persönliche Mitteilung) stammt ein Vorschlag, der den Austritt von Gentamicin aus dem Prüfkörper in prinzipiell ähnlicher Weise verlangsamen soll: Diese Autoren haben vorgepreßte β -TCP-Sinterkörper nach der Beschickung mit Gentamicin mit einem Triglycerid präpariert. Wie die REM-Aufnahmen von der Ober- und Bruchfläche dieser Prüfkörper belegen, ist dadurch eine gewisse mechanische Verlegung der Poren in der Keramik möglich, ohne daß es zum gänzlichen Verschluß kommt. Wir halten dies für einen vielversprechenden Weg in der Entwicklung eines Drug-Depots auf TCP-Basis, sofern die Knochenverträglichkeit und Resorbierbarkeit der Träger-substanz dadurch nicht gemindert wird. Die Bedeutung einer solchen pharmazeutischen Präparation ist auch in der universellen Anwendbarkeit gegeben, da der Retardeffekt möglicherweise auch für andere Wirksubstanzen, die für Drug-Depots in der Mundhöhle diskutiert werden (z.B. Anti-Plaqué-, Anti-Karies-Substanzen u.a., BROOK 1984), zutreffen kann. Speziell für das Gentamicinsulfat ist auch ein anderer Weg denkbar, um die Freisetzung dieser extrem gut wasserlöslichen Substanz zu verzögern. Durch Austausch der Sulfatgruppen gegen eine Gruppe des Hesperidin-diphosphate-di-Na-Salz, soll die Löslichkeit in Wasser erheblich reduziert werden (KIRCHLECHNER et al 1982). Allerdings kann dieses Vorgehen zu Problemen bei der Beladung des Depots mit einem Wirkstoff führen, der nun wesentlich weniger wasserlöslich ist (ALEX, persönliche Mitteilung). Bei allen erörterten Depotmodellen ist für die Anwendung am Menschen entscheidend, welcher Kinetik die Wirksubstanz am Patienten unterliegt. Neben den Faktoren die sich aus der Art des Depots und den Eigenschaften seiner Inhaltsstoffe ergeben, ist auch die biologische Reaktion am Ort der Implantation zu berücksichtigen. Auf die Rolle der bindegewebigen Kapsel als physiologische Barriere gegen Substanzen, die aus einem Depotpräparat abströmen, hat bereits ANDERSON (1981) aufgrund von Untersuchungen an Silicon-Drug-Depots hingewiesen. Im Gegensatz zu diesem Material handelt es sich bei uns um ein resorbierbares Trägermaterial, das im Knochen eine Einheilung ohne Bindegewebehülle erwarten läßt. Aus diesen Gründen ist auf die Einheilung unserer

β -TCP-Drug-Depots unter Bedingungen, die einer späteren klinischen Anwendung ungefähr entsprechen, einzugehen.

Bei der feingeweblichen Untersuchung der nichtentkalkten Knochenschnitte konnte zwischen Gentamicin-haltiger und Antibiotika-freier Keramik kein Unterschied festgestellt werden. Dies ist bei einer Gentamicin-Dosis von 1,5 mg/ Prüfkörper bei sehr rascher Freisetzung auch kaum anders zu erwarten, da nach bisheriger Erfahrung ähnlich konzipierte Drug-Depots mit Gentamicin (Septopal^R; Genta-Koll^R) ebenfalls eine gute Gewebe- und Knochenverträglichkeit besitzen.

Im Knochen zeigten die Keramik-Prüfkörper eine gute, zum großen Teil bindegewebsfreie Anlagerung von Knochenregeneraten an der Keramikoberfläche. Allerdings ist dies von der Lagestabilität des Implantates abhängig. Wie die Pseudarthrosenpräparate deutlich erkennen lassen, kann Knochen nur an ein völlig ruhig liegendes Präparat heranwachsen, wobei zwischen dem Ort der Knochenneubildung und dem Implantat selbst keine Relativbewegungen möglich sein sollten. Dies verdeutlicht der Vergleich zweier Pseudarthrosenpräparate, bei denen die Falschgelenkbildung offensichtlich in einer unterschiedlichen Heilungsphase eingetreten ist. Bei den Präparaten der Tiere 0401 re Femur, 0403 li Femur, 0405 li Femur, 0407 li Femur, 0408 li Femur, 0409 li Femur, liegt zwischen Prüfkörper und Pseudarthrosenstumpf ein faserreiches Kallus- bzw. bindegewebiges Pseudarthrosengewebe. Nur vereinzelt treten mineralisierte Knocheninseln auf, die zum Teil auch von nekrotischen Knochensplittern herrühren. Bei der Pseudarthrose des Tieres 0402 li Femur ist die Spontanfraktur offensichtlich nach stabiler Einheilung des Keramikkörpers eingetreten. Der Bruch teilt den Prüfkörper in 2 Fragmente, die beide am Knochen weiter haften. Hier haben wir den einzigen Fall einer Pseudarthrose mit fest in den Knochen eingehielten Keramikimplantaten. Im Falschgelenk reibt die Cortikalis des einen Knochenstumpfes auf der am anderen Stumpf eingehielten Keramikfläche. Offensichtlich muß ein flächenhafter, relativ glatt begrenzter Keramikabrieb in geringem Umfang stattgefunden haben, da keine gezackte Bruchfläche mehr vorliegt. Der mechanische Abrieb der Keramik läßt sich durch den relativ glattlinigen Verlauf von dem resorptiven Abbau im Knochenlager unterscheiden, der stets eine bogige, unregelmäßige Begrenzungslinie zeigt.

An den Pseudarthrosen, in denen der Keramikkörper wie ein Sperrknochen

(BRANDT 1937) die Knochenfragmente mechanisch am Kontakt hindert, finden wir ebenfalls geringen mechanischen Abrieb der Keramik, erkennbar an den abgerundeten Ecken und gelegentlich angedeuteten sanduhrartigen Einziehungen in der Prüfkörpermitte. Auf den Schnittbildern korrespondieren diese Abriebsformen gut mit den Reibungspartnern, d.h. den Knochenflächen des proximalen und distalen Femurstumpfes. Die Markhöhlen haben sich mittlerweile durch geflechtartigen bzw. lamellären Knochen geschlossen; durch periostale Knochenregeneration in der Kallusspindel hat sich eine elefantenfußartige Verdickung der Pseudarthrosenstümpfe ergeben, wobei sich ober- und unterhalb des Prüfkörpers eine Art neuer Gelenkpfanne gebildet hat. In der kranialen Gelenkpfanne regeneriert der Knochen in der Richtung auf den Prüfkörper, in der kaudalen Gelenkpfanne scheint im Pseudarthrosenspalt Knochenabbau vorzuliegen, während vom Endost aus sich neuer Knochen anlagert und auf diese Weise eine Eröffnung der Markhöhle verhindert. Möglicherweise bestätigen sich hier bereits von FICK und PAUWELS (1960) beschriebene Untersuchungen, die sich mit der Ausbildung eines neuen Gelenkkopfes und einer neuen Gelenkpfanne an der Pseudarthrose beschäftigen. Anhand von Modellversuchen mit frakturierten Gipsstäben, die mit einer Gummihülle versehen und einer Knickbewegung ausgesetzt worden sind, konnten diese Autoren zeigen, daß die Lokalisation des Gelenkkopfes bzw der Pfanne am oberen oder unteren Fragment von der Lokalisation der Pseudarthrose im Verhältnis zum Ansatz der einwirkenden Muskeln abhängig war. Bei den Pseudarthrosen in unserem Tierexperiment war die biomechanische Situation insofern anders, als hier nicht zwei Knochenflächen aufeinander, sondern Knochen auf Keramik in Kontakt getreten sind. Offensichtlich ist die mechanische Abnutzung der Keramik bis auf die beschriebene Abrundung gering gewesen, daß von den Knochenstümpfen her bei dem Versuch, die Kontinuität wieder herzustellen, die Knochenregeneration zu einer Art Gelenkpfanne geführt hat.

An den nichtfrakturierten Femora ließ sich die knöcherne Einheilung unter ruhigeren mechanischen Bedingungen beobachten. An zahlreichen Präparaten ließ sich erkennen, so daß die Vorbohrung um etwa ein 1/10 mm größer als der Keramikkörper ausgefallen ist. Der verbleibende Spaltraum in der Cortikalis war zumeist mit einem Knochenregenerat aus geflechtartigem und lamellärem Knochen ausgefüllt, wobei der Knochen sich der Keramikoberfläche ohne trennende Bindegewebsschicht anlegte. Der jeweilige Grad an Geflecht- und

Lamellarknochen ist in gewissem Umfang als Indikator für die mechanischen Bedingungen anzusehen, die zum Zeitpunkt der Knochenbildung geherrscht haben. Der über das Knochenniveau der Kompakta herausragende Prüfkörper war in der Bohrung kaum festgeklemmt und durch umliegende Muskeln gewissen Kräften ausgesetzt. So läßt sich bei stärkerer mechanischer Unruhe das Vorherrschen von Geflechtknochen bzw bei gut fixiertem Prüfkörper die Entwicklung von lamellärem Knochen erklären. Im Markraum, der auf Höhe des Trochanter major nur noch wenige spongiöse Trabekel aufweist, ist häufig zumindest eine dünne Knochenlamelle zu beobachten, die zungenartig an der Prüfkörperoberfläche entlangwandert, bis sie die gegenüberliegende Kompakta erreicht hat. Ansonsten sind solche Trabekel, die sich geradewegs von der einen zur anderen Kompakta erstrecken, in der normalen Spongiosaarchitektur des Rattenfemurs selten zu beobachten. Möglicherweise stimuliert der Prüfkörper das Remodeling der Spongiosaarchitektur aufgrund einer Änderung der biomechanischen Belastungsverhältnisse oder aufgrund seiner osteokonduktiven Eigenschaften. Vielleicht steckt dahinter auch ein Separierungsvorgang, der die Trennung der Markhöhle von den Fremdkörpern zum Ziele hat.

Ein Hinweis darauf, daß die physiologischen Umbauvorgänge am Knochen durch die Implantation von Prüfkörpern in Sinne einer Aktivierung beeinflusst worden sind, läßt sich auch aus den fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen ersehen. Im Allgemeinen kann man bei stabilen mechanischen Verhältnissen vermuten, daß die durch das Operationstrauma bedingten reparatorischen Vorgänge nach etwa 3 Monaten zur Ruhe gekommen sein müßten, einen komplikationlosen Heilungsverlauf vorausgesetzt. Bei unseren Untersuchungen ist an den älteren Präparaten stets eine vermehrte Tetracyclin-Aufnahme in der knöchernen Umgebung der Implantate aufgefallen. Sehr oft waren die markierten Bande nicht so schmal und scharf begrenzt wie am übrigen Femurknochen, sondern breitflächiger und diffuser. Ein besonderer Zusammenhang mit den Resorptionsvorgängen an der Keramik, z.B. in der Art, daß in solchen Regionen eine erhöhte Fluoreszenz zu beobachten wäre, ist bei der einfachen visuellen Durchmusterung der Präparate nicht aufgefallen. Wir möchten diesen Befund eher in der Richtung interpretieren, daß durch die Knochenbohrung eine mechanische Schwächung im Bereich des Röhrenknochens gesetzt worden ist, die durch einen eingeeilten Keramikzylinder nicht in der ursprünglichen Art kompensiert werden konnte. Im Sinne des Wolff'schen Transforma-

tionsgesetzes versucht der Knochen auf die mechanische Belastung mit verstärkten Umbauprozessen zu reagieren. Dieser mechanische Effekt ist bei Knochenversuchen zu berücksichtigen, worauf auch HEIMKE (1978) aufmerksam macht.

In diesem Zusammenhang ist auch auf die Frage einer Osteoporose nach der Implantation von TCP-Keramik, wie sie von KREMPIEN (1984) diskutiert wird, näher einzugehen. Diese Hypothese geht von der Vermutung aus, daß durch ständigen Abbau der TCP-Keramik eine Stimulierung der für die Phagozytose zuständigen Zellen stattfindet, die sich auf den Umbau des natürlichen Knochens im Sinne einer Osteoporose auswirken könnte. Unsere Versuche sind vom Aufbau her nicht geeignet, um diese Fragen grundsätzlich zu klären, da keine entsprechenden Röntgenaufnahmen bzw. Kalziumbestimmungen durchgeführt worden sind. Jedoch sprechen die gesteigerten Mineralisationsvorgänge in der Umgebung der β -TCP-Zylinder, wie wir sie zumeist gesehen haben, gegen eine derartige Vermutung. Am Versuchstier sind uns in einem Zeitraum bis 10 1/2 Monaten nach der Operation keine osteoporoseähnlichen Veränderungen der Femora aufgefallen.

Für die klinische Anwendung des von uns erprobten Drug-Depot erscheint es uns bedeutsam, daß das Präparat resorbierbar ist. Nachdem es seine Funktion erfüllt hat und die Knocheninfektion zur Ruhe gekommen oder ausgeheilt ist, ist es wünschenswert, daß im Knochen kein Fremdkörper zurückbleibt, der Anlaß zu potentiellen Komplikationen sein könnte. Bei der Untersuchung der Schnittpräparate haben wir deshalb besonderes Augenmerk auf die Resorptionsvorgänge an der Keramik gelegt. Zwischen Gentamicin-haltigen und Antibiotika-freien Implantaten ist uns auch in dieser Hinsicht kein nennenswerter Unterschied aufgefallen. Deutliche Arrosionen sind bereits nach wenigen Wochen an der Prüfkörperoberfläche auszumachen, wobei aber erhebliche Schwankungen möglich sind. Beispielsweise waren an einem Implantat nach 10 1/2 Monaten weitaus geringere Abbauerscheinungen zu sehen als bei anderen Keramikkörpern nach ca. 2–3 Monaten. Wichtige Voraussetzungen für den biologischen Abbau scheint eine mechanisch ruhige Lagerung im Knochengewebe zu sein. Prüfkörper im Weichgewebe oder unstabil zwischen Pseudarthrosenstümpfen und Kallusgewebe zeigten keinerlei Resorptionen, bestenfalls geringfügige mechanische Abnutzungen durch scheuerne Fragmentenden. Diese Art des Abriebs ließ sich von der biologischen Resorption, wie

bereits erwähnt, klar unterscheiden. Typisch für die Biodegradation erscheint uns die Ausbildung von bogig begrenzten Arrosionsbuchten oder –höhlen, die zu Beginn an einzelnen Stellen relativ tief unter die Oberfläche des Prüfkörpers reichen können. Am Grunde dieser Lakunen ist die granuläre Struktur der Keramik aufgelockert. Einzelne Partikel haben sich zumeist abgelöst und liegen im Lumen. Frische Resorptionslakunen sind oft mit gangartigen Strukturen des benachbarten Knochens vergesellschaftet, so daß sich der Vergleich mit den Bohrkanälen und 'cutter – cones' aufdrängt, wie sie im Rahmen der Umbauvorgänge bei der primären Knochenbruchheilung beschrieben worden sind (SCHENK 1978, SCHENK u. WILLENEGGER 1964).

Der resorptive Abbau der TCP – Keramik erfolgt demnach nicht allein als eine hydrolytische Spaltung des Materials durch die Gewebeflüssigkeit im Extrazellulärraum. Obwohl dieser Weg in gewissem Umfang in vitro möglich erscheint (FISCHER – BRANDIES et al 1985), ist es wahrscheinlich nicht der Hauptabauweg, der für die wesentliche Quantität des abgebauten Keramikmaterials in Frage kommen dürfte. Vielmehr sind dafür wohl spezifische Elemente verantwortlich, die sich nur im Knochen unter mechanischer Ruhe finden. Anders läßt sich die ausbleibende Resorption der Prüfkörper im Weichgewebe und in den Pseudarthrosen kaum einleuchtend erklären. Soweit unsere etwa 50 µm starken, unentkalkten Akrylatschnitte eine Zelldifferenzierung erlaubt haben, konnten wir in den Resorptionslakunen Bindegewebszellen mit zipfligen Kernen und Makrophagen mit rundlichen bis ovalen Zellkernen erkennen, die in der KOSSA – Toluidinblau – Färbung sich nur blaß angefärbt haben, aber eine deutliche Kernmembran und zumeist 1 oder 2 kleine Nukleoli aufgewiesen haben. Relativ häufig waren auch basophil granulierten Zellen zu beobachten, deren Granula oft halbkreis – oder kreisförmig gruppiert waren. Im Gefolge dieser Zellen konnte man Gefäßsprossen, Präosteoblasten und Osteoblasten mit Osteoidbildung ausmachen. Nur ganz vereinzelt sind mehrkernige Osteoklasten aufgefallen; sie scheinen bei dem Abbau des keramischen Fremdmaterials keine besondere Rolle zu spielen. An flachen Resorptionslakunen in der Keramik, die sich offensichtlich in der Initialphase befinden, haben wir öfters die Beobachtung gemacht, daß sich entsprechende Resorptionsbuchten auf der Knochenseite finden. Hier waren allerdings typische Howship – Lakunen mit Osteoklasten nicht erkennbar, sondern lediglich das oben beschriebene Gewebe. Die enge räumliche Nachbarschaft von Knochen – und Keramik – Abbau

legt die Vermutung nahe, daß diese Prozesse im Rahmen des physiologischen Knochenumbaus zu sehen sind. Dafür spricht auch die Beobachtung, daß anschließend nach der Resorption des Fremdmaterials neu gebildete Knochen in die Resorptionsbucht einsproßt und hier im engen Verbund mit der Keramikoberfläche zu einer festen Verzahnung des Prüfkörpers mit dem Lager führt.

Der direkte Knochen–Keramik–Verbund hat sich auch bei der rasterelektronischen Untersuchung an Femurpräparaten deutlich dargestellt. Selbst kleinste Keramikpartikel, leicht erkennbar an der hexagonalen Bruchfläche, werden völlig vom Knochen eingemauert, ohne eine bindegewebige Zwischenschicht. In dem Lumen von abführenden Havers'schen Kanälen finden sich teilweise abgesprengte Keramikpartikel, die vermutlich durch resorptiven Abbau hierhergeelangt sind. Ähnliche Bilder sieht man auch an den Akrylatschnitten. Jedoch läßt sich hier die resorptiv abgelöste Keramik von artefiziell bei der Sageschnittpräparation verschlepptem Material kaum abgrenzen. Da im Rastermikroskop lediglich Oberflächenstrukturen dargestellt werden, läßt sich über die zelluläre Reaktion nur wenig aussagen, obwohl Osteozyten, Knochenmarkszellen und Erythrozyten deutlich zu erkennen sind. Intrazellulär gespeicherte Substanzen haben wir aus diesem Grunde nicht nachweisen können.

Die bei den Resorptionsvorgängen im Lichtmikroskop beschriebenen Strukturauflockerung der Keramik war im REM ebenfalls zu beobachten. Die Abspaltung der Granula scheint nach einem Aufbrechen der intergranulären Brücken einzutreten. Vorstadien sind Risse in diesem Bereich, in denen sich oftmals die hexagonale Struktur des Kristallgefüges widerspiegelt. Insgesamt bestätigen die REM–Aufnahmen die ausgezeichnete Knochenverträglichkeit des geprüften Keramikmaterials, wie sie bereits bei der licht– und fluoreszenzmikroskopischen Untersuchung festzustellen war.

Die REM–Untersuchung der Ober– und Bruchfläche der Keramikzylinder im Zustand vor der Implantation gibt anschauliche Vorstellungen darüber, in welcher Weise die Freisetzung des Wirkstoffes aus dem Keramik–Drug–Depot beeinflußt werden kann. Je nach Porosität finden wir zwischen den bei der Sinterung durch Brücken verbundenen Granula ein ausgeprägtes Schwammwerk von Poren, das den ganzen Prüfkörper durchzieht. Die Poren stehen dabei untereinander in Verbindung. Auf diese Weise wird eine erhebliche Oberflächenvergrößerung der Trägersubstanz erreicht, die eine sehr schnelle Abgabe des Wirkstoffes begünstigt. Die Imprägnierung des Keramikmaterials

mit einem Triglycerid als Hilfsstoff führt zu einer Versiegelung der inneren und äußeren Keramikoberfläche, wodurch das Porensystem nicht vollständig verschlossen wird. Das lipophile Material läßt sich auch in der Tiefe des Zylinderimplantates nachweisen. Hier findet es sich jedoch lediglich in dünnen Fetzen an der Oberfläche des Gangsystems, ohne die Öffnungen zu obturieren. Ob eventuell durch hydrophobe Eigenschaften des Retardstoffes bzw. durch Änderung der Oberflächenspannung und der Kapillarwirkung das Diffusionsverhalten wasserlöslicher Wirkstoffe entsprechend im Sinne einer gewünschten Freisetzungverzögerung beeinflußt werden kann, läßt sich in einer morphologisch – beschreibenden Untersuchung allerdings nicht entscheiden. Aufschluß darüber ist in den pharmakokinetischen und histologischen Untersuchungen von ALEX und WESSELOWSKY zu erwarten, die das gleiche Keramikmaterial an der Ratte und am Kaninchen studiert haben. Sollte sich der Verzögerungseffekt als unzureichend erweisen, so könnte die tiefere Einbringung größerer Hilfsstoffmengen in das Gangsystem aufgrund unserer Befunde eine Verringerung der inneren Oberfläche und damit eine geringere Abgabe des Wirkstoffes bewirken.

Zusammenfassend möchte ich folgende Ergebnisse und Schlußfolgerungen dieser Arbeit herausstellen:

- β - TCP - Keramik mit einer Mikroporosität von 22% (Porendurchmesser: ca 2 – 10 μm) heilt im Rattenfemur sowohl mit Gentamicin – Zusatz als auch ohne Zusatz gut ein.
- Der Verbund zwischen Keramik und Knochen ist bei mechanischer Ruhe direkt und bindegewebsfrei.
- In der Muskulatur verursacht die Keramik keine heterotope Knochenbildung.
- Unser Material erwies sich als langsam resorbierbar.
- Der Abbau der Keramik findet nur in direktem Kontakt mit dem Knochen und bei mechanischer Ruhe statt, er scheint von dem physiologischen Remodeling des Knochens abhängig zu sein.

- Die Resorptionsgeschwindigkeit der Keramik ist langsamer als die Abgabe des Gentamicins.
- Im Vergleich mit intraperitoneal verabreichtem Gentamicin ist die Wirkstoffabgabe nach lokaler Applikation in Form von Gentamicin – TCP – Matrices etwas verzögert (ca. 1 Woche).
- Ein möglicher zusätzlicher Depot – Effekt ist abhängig von den lokalen Verhältnissen um das Implantatlager (z.B. Hämatom).
- Um eine stärkere Retardierung des Wirkstoffes in porösen Keramik – Matrices aus β – TCP zu erreichen, erscheint die Verwendung von freisetzungverzögernden Hilfsstoffen erforderlich.

7. Zusammenfassung

In die Femora von 10 weiblichen, ca. 300 gr schweren Sprague–Dawley–Ratten wurden jeweils zwei Zylinder, bestehend aus β –TCP–Sinterkeramik (2,96 mm Durchmesser, 4 mm Höhe, Porosität 22%, Porendurchmesser ca. 2 – 10 μ m, Gentamicindosis 1,5 mg), implantiert. Die Reinheit der Keramik konnte durch REM–Untersuchungen der Keramikoberfläche und der Bruchfläche nachgewiesen werden.

Der Urin wurde in 24stündigen Intervallen 2 Wochen lang gesammelt, um die Menge des aus dem β –TCP–Keramikkörpers freigesetzten Gentamicinsulfates bestimmen zu können. Die Gentamicinkonzentration im Urin wurde mit dem Agardiffusionstest gegen eine Gentamicin–Standard–Verdünnungsreihe in Phosphatpufferlösung ermittelt.

Im Vergleich mit der gleich hohen intraperitonealen verabreichten Wirkstoffdosis konnte nach lokaler Applikation in Form von Gentamicin–TCP–Matrices eine etwas langsamere Wirkstoffabgabe erreicht werden.

Die Femora der Ratten wurden nach einer Liegedauer der Implantate von 4, 10, 14, 30, und 42 Wochen entnommen. Nach entsprechender Präparation wurden sie lichtmikroskopisch, fluoreszenzmikroskopisch und mikroradiographisch untersucht. Die Befunde lassen den Schluß zu, daß das β –TCP eine gute lokale Gewebeverträglichkeit, unabhängig vom antibiotischen Zusatz, aufweist. Die Resorption der Keramik wurde bereits nach einer Verweildauer des Implantates von 4 Wochen beobachtet. Die untersuchten regionalen Lymphknoten wiesen weder eine Fremkörperreaktion noch abgelagerte Keramikpartikel auf.

Ein modifiziertes TCP–Drug–Depot, das zur Retardierung des Wirkstoffes mit einem Triglycerid präpariert war, zeigte im REM nach 10 Monaten Liegezeit im Rattenfemur einen unauffälligen, dichten Keramik–Knochenverbund, wobei der Fettanteil im Inneren der Keramik erhalten blieb.

8. Literaturverzeichnis

1. Addicks, H. - W., Ausermann, K. - H., Becker, R.: Zur Therapie der chronischen Unterkieferosteomyelitis. Dtsch. Z. Mund- Kiefer- Gesichts- Chir. 8, 165 - 167, (1984).
2. Aderholt, L.: Die lokale Behandlung von Knocheninfektionen mit den Gentamicin-PMMA-Miniketten in der Kiefer- und Gesichtschirurgie. Dtsch Z. Mund- Kiefer- Gesichts- Chir. 9, 94 - 101, (1985).
3. Alex, R.: Pharm. Inaugr. Diss., München (1986).
4. Anderson, J.M., Niven, H., Pelagalli J., Olanoff, L.S., and Jones, R.D.: The role of the fibrous capsule in the function of implanted drug-polymer sustained release systems. J. Biomed. mat. Res. 15, 889 - 902, (1981).
5. Antibiotica Fibel, Hrsg. Otten, H. Plempel, M.U., Siegenthaler, W., Thieme, Stuttgart (1975).
6. Bedacht, R.: Tierexperimentelle und klinische Untersuchungen über die Anwendung von heterologem Kollagen als Implantat in der Knochenhöhle von Röhrenknochen. Med.Habil.Schrift, München (1969).
7. Bhaskar, N.: Biodegradable ceramic implants in bone. Oral Surg. 32, 336 - 346, (1971).
8. Boone, M.E., Kafrawy, A.H.: Pulp reaction to a tricalcium phosphate ceramic capping agent. Oral Surg. 47, 396 - 379, (1979).
9. Brook, I.M., van Noort, R.: Controlled Delivery of Drugs. Br Dent J., 157, 11 - 15, (1984). 10. Burri, C.: Posttraumatische Osteitis. Huber, Bern, Stuttgart, Wien, (1974).
11. Burri, C., Rüter, A.: Lokalbehandlung chirurgischer Infektionen. Huber, Bern, Stutgart, Wien, (1979).
12. Burri, C., Lob, G.: Taurolin-Gel in der Osteitis-Behandlung. Akt. Traumat., 12, 159 - 165, Thieme, Stuttgart, New York, (1982).
13. Dingeldein, E.: Spektrum und Empfindlichkeit bakterieller Erreger unter der Behandlung von Knocheninfektionen mit Gentamicin-Polymethylmethacrylat. Lokalbehandlung chir. Infektionen. Hrsg. Burri, C., Rüter, A., Huber, Bern, Stuttgart, Wien, S. 113, (1979).

14. Dulce, H.J.: Knochenumbau und Calciumphosphatstoffwechsel. Klinische Osteologie A, Hrsg. Kühlendorf, E., Bartelheimer, H., Springer, Berlin, Heidelberg, New York, (1980).
15. Eder, M., Zit. n. Rhomberg, B.: Einheilung einer β - Tricalciumphosphat - Gentamicin - Kombination im Tierversuch. Med. Diss. München, (1986).
16. Eitenmüller, J., Peters, G., Golsong, W., Weltin, R., Reichmann, W.: Resorbierbare Antibiotikum/Antiseptikum Trikalziumphosphat - Keramik zur lokalen Behandlung der Osteomyelitis. Eine tierexperimentelle Untersuchung am Hund. Chir. Forum 1983 f. exper. u. klin. Forschung, Hrsg. H. W. Schreiber, Springer, Berlin, Heidelberg, (1983), S. 133 - 140.
17. Eitenmüller, J., Peters, G., Golsong, W., Weltin, R., Gellisen, G., Reichmann, W.: Die Freisetzungsverzögerung von Polyvinylpyrrolidon - Jod - Komplex aus porösen, resorbierbaren Tricalziumphosphatkeramik - Granula durch die Verwendung löslicher Überzüge zur lokalen Behandlung der Osteomyelitis. Unfallheilkunde 87, 517 - 523, (1984).
18. Fankhauser, P.: Kuststoffe für Arzneimittelabgabesysteme. Acta Pharm. Technol. 28, 311 - 327, (1982).
19. Fick, zitiert nach Pauwels, F.: Gesammelte Abhandlungen zur funktionellen Anatomie des Bewegungsapparates. Springer, Berlin, Heidelberg, New York, (1965), S. 170.
20. Fischer - Brandies, E., Dielert, E., Bagambisa, F.: Grenzschichtstrukturen von Hydroxylapatit - Knochen beim Hund. Fortschr. zahnärztl. Implantol. 1, 224 - 227, (1985).
21. Flores de Jacoby, L., Sulka, H., Preusse, G.: Über die Verwendung von Bindegewebe des Gaumens und Trikalziumphosphat (TCP) zur Knochenbildung sowie der 'Swaging - Methode' im Bereich des Parodontalknochens. Dtsch. zahnärztl. Z. 34, 322 - 325, (1979).
22. Götz, J., Wesch, G.: Behandlung der chronischen Osteomyelitis mit Tauro-lonin - Gel - Stäben. Z. Orthop. 119, 540 - 543, (1981).
23. Graham, N. B., Wood, D. - A.: Hydrogels and Biodegradable Polymers for the Controlled Delivery of Drugs. Polymer News 8, 230 - 236, (1982).
24. Heide, H., Köster, K., Lucas, H.: Neuere Werkstoffe in der medizinischen Technik. Chemie - Ing - Techn. 47, 327 - 333, (1975).

25. Heimke, G., Griss, P., Jentschura, G., Werner, E.: Die Aussagefähigkeit histologischer Befunde zur Beurteilung von Knochenersatzwerkstoffen. Arch. Orthop. Traumat. Surg. 91, 267 – 276, (1978).
26. Heuck, F., Wanselow: Radiologische, Histologische und Biochemische Untersuchungen. Klinische Osteologie A, Hrsg E. Kühlendorf und H. Bartelheimer, Springer, Berlin, Heidelberg, New York, (1980).
27. Horch, H.H., Köster, K.: Resorbierbare Kalziumphosphatkeramik zur Füllung enoraler Knochendefekte. Eine neue Methode der Behandlung großer Kieferzysten. Dtsch. Z. Mund Kiefer Gesichts Chir. 7, 143 – 150, (1983).
28. Horch, H.H., Stegmann, B.: Erfahrungen mit dem resorbierbaren TCP-Keramikgranulat zur Füllung größerer Knochendefekte nach Zystektomie im Kieferbereich. Dtsch. Zahnärztl. Z. 40, 672 – 677, (1985).
29. Jacobs, G.: Kalziumphosphat-Keramik-werkstoffkundliche Aspekte. Tierexperiment und Stand der klinischen Anwendung. Bayerischer Zahnärztetag, München (1983). Hrsg. Bayerische Landes Zahnärztekammer, München (1983).
30. Jacobs, H. G., Luhr, H. G., Krause, A., Überall, H.: Knochendefektfüllung mit granulärer Kalziumphosphatkeramik. Dtsch. Z. Mund Kiefer Gesichts Chir. 8, 38 – 42, (1984).
31. Jones, S.J., Boyde, A., Ali, N.N., Maconnachie, E.: Bone modelling in the implantation bed. J. Biomed. Mat. Res. 19, 199 – 224, (1985).
32. Jones, S. J., Boyde, A., Ali, N. N., Maconnachie, E.: A Review of Bone Cell and substratum Interactions. Scanning 7, 5 – 24, (1985).
33. Joos, U.: Die Knochenregeneration nach Zystenoperationen. Dtsch. Z. 40, 661 – 663, (1985).
34. Kaiser, G., Wagner, W., Tetsch, P., Köster, K.: Zur Regeneration knöcherner Defekte nach der Implantation resorbierbarer Kalziumphosphatkeramik. Eine vergleichende klinische Untersuchung. Dtsch. Zahnärztl. Z. 35, 108 – 111, (1980).
35. Kallenberger, A.: Die Wirkung von Biokeramik (Kalziumphosphatkeramik) auf kultivierte Kaninchenfibroblasten. Schweiz. Mschr. Zahnheilk. 88, 90 – 99, (1978).
36. Karbe, E., Köster, K., Kramer, H., Heide, H., Kling, G., König, R.: Knochenwachstum in porösen, keramischen Implantaten beim Hund. Langenbecks Arch. Chir. 338, 109 – 116, (1975).

37. Kirch, J. – M.: Lokale Chemotherapie bei Kieferosteomyelitis, med. Dissert. München, (1985).
38. Kirchlechner, R., Orth, D., Dingeldein, E., Wahlig, H.: (Merck Patent G. m. b. H.) Ger. Offen. DE 3206726, 1983, Appl. 25, Feb. 1982.
39. Klein, C.P.A.T., Abe, Y., Hosomo, H., K. de Groot: Different calcium-phosphate bioglass ceramics implanted in rabbit cortical bone. An interface study. *Biomaterials* 5, 362 – 364, (1984).
40. Klein, C.P.A.T., Driessen, A. A., K. de Groot: Relationship between the degradation behaviour of calcium phosphate ceramics and their physical – chemical characteristics and ultrastructural geometry. *Biomaterials* 5, 157 – 160, (1984).
41. Klein, C.P.A.T., K. de Groot, Driessen, A. A., van der Lubbe, H. B. M.: Interaction of biodegradable β – whitlockite ceramics with bone tissue. An in vivo study. *Biomaterials* 6, 189 – 192, (1985).
42. Klemm, K.: Die Behandlung chronischer Knocheninfektionen mit Gentamicin – PMMA – Ketten und Kugeln. *Unfallchir. Sonderheft* 1, S. 20, (1976).
43. Klemm, K.: Posttraumatische Osteomyelitis: Temporäre Implantation von Septopal^R – Ketten zur ergänzenden lokalantibiotischen Behandlung. *Dtsch. Ärzteblatt* 39, S. 2281, (1980).
44. Klug, W., Dude, H., Gabsch, H. Ch.: Der Gehalt an alkalischer Phosphatase, Mengen – und Spurenelementen im Serum und im kompakten Knochen des Kaninchens. *Physiologie und Pathologie des Knochensystems. Z. exp. chir. Transplant. künst. Organe* 18, 19 – 24, (1985).
45. Klug, W., Dude, H., Schulze, M., Gabsch, H. Ch.: Mengen – und Spurenelemente im Kallus während der sekundären Knochenbruchheilung, tierexperimentelle Untersuchungen. *Z. exp. chir. Transplant. künst. Organe* 18. 25 – 32, (1985).
46. Knese, K. H.: Entwicklungsgeschichte, Anatomie, Histologie. *Klinische Osteologie A.* Hrsg. E. Kuhlencordt, H. Bertelheimer, Springer, Berlin, Heidelberg, New York, (1980).
47. Köhler, S. T., Retemeyer, K., Berger, G., Carow, R., Meyer, R.: Resorbierbare Keramiken in der tierexperimentellen Erprobung. *Dtsch. Gesundh. Wesen* 35, 1343 – 1345, (1980). 49. Köster, K., Heide, H., König, R.: Histologische Untersuchungen an der Grenzfläche zwischen Knochengewebe und Calciumphosphat – Calciumaluminat – und Aluminiumoxid-

48. Köster, K., Karbe, E., Kramer, H., Heide, H., König, R.: Experimenteller Knochenersatz durch resorbierbare Kalziumphosphat - Keramik. *Langenbecks Arch. Chir.* 341, 77 - 86, (1976).
49. Köster, K., Heide, H., König, R.: Histologische Untersuchungen an der Grenzfläche zwischen Knochengewebe und Calciumphosphat - Keramik. *Langenbecks Arch. Chir.* 341, 77 - 86, (1976).
50. Köster, K., Heide, H., König, K.: Resorbable Calcium Phosphate Ceramics under Load. *Langenbecks Arch.* 343, 173 - 184, (1977).
51. Köster, K., Heide, H.: Bioaktive Calciumphosphatkeramik für den Knochen - und Zahnersatz. Sonderausdruck aus *Biotechnische Umschau* 2, 226 - 228, (1978).
52. Köster, K., Ehard, H., Kubicek, J., Heide, H.: Experimentelle Anwendung von Calciumphosphatgranulat zur Substitution von konventionellen Knochen transplantaten. *Orthop* 11, 398 - 403, (1979).
53. Köster, K., Heide, H.: Therapeutische Ersatzmöglichkeiten einer neuentwickelten Keramik in der veterinärmedizinischen Knochenchirurgie. *Dtsch. tierärztl. Wschr* 45, 67 - 69, (1979).
54. Levin, M., Getter, L., Gutricht, D.E.: A Comparison of iliac Marrow and Biodegradable Ceramic in Periodontal Defects. *J. Biomed. Mat. Res.* 9, 183 - 195, (1975).
55. Luft, F.C., Kleit, S.A.: Renal Parenchymal Accumulation of Aminoglycoside Antibiotics in Rats. *Infect. Dis.* 130, 656 - 659, (1974).
56. Luft, F.C., Patel, V., Yum, M.N., Patel, B., Kleit, S.A.: Experimental aminoglycoside nephrotoxicity. I. *Lab. clin. med.* 86, (1975).
57. Matthews, J.L.: Bone structure and ultrastructure. Fundamental and clinical bone physiology. Edited by Marshall, R., Urist, M.D., 1972. Philadelphia, Toronto, J.B. Lippincott company.
58. Metsger, D.S., Driskell, T.D., Paulsrub, J.R.: Tricalcium phosphate ceramic - a resorbable bone implant. Review and current status. *JADA* 105, 1035 - 1038, (1982).
59. Mors, W.A., Kaminski, E.J.: Osteogenic Replacement of Tricalcium Phosphate Ceramic implants in the dog palate. *Archs oral Biol.* 20, 365 - 367, (1975).

60. Nelson, F.J., Stanford, H.G., Cutright, D.E.: Evaluation and comparisons of biodegradable substances as osteogenic agents. *Oral Surg.* 43, 836 - 843, (1977).
61. Neumann, Auwärter, N.: Pharmakologische und therapeutische Eigenschaften von Gentamicin. *Arzneimittelforschung* 9, 1119 - 1125, (1968).
62. Newesely, H.: Grundprinzipien bioreaktiver Implantatsstoffe. *Zahn - Mund - u. Kieferheilkd.* 72, 230 - 239, (1984).
63. Ochsner, P.E., Berchtold, D., Uehlinger, K., Verburg, A.: Ein - und Abbau von resorbierbarem Tricalciumphosphatgranulat (Vorläufiger Bericht). *Hefte Unfallheilk.* 165, 77 - 79, Hrsg. Burri, C, Heim, U., Poigenfürst, J., Springer, Berlin, Heidelberg, (1983).
64. Ochsner, P.E., Berchtold, D., Uehlinger, K.: Ein - und Abbau von resorbierbarer TCP - Keramik in Granulatform. *Z. Orthop.* 122, 573, Enke, F., Stuttgart, (1984).
65. Osborn, J.F., Donath, K.: Die enossale Implantation von Hydroxylapatitkeramik und Tricalciumphosphatkeramik: Intergration versus Substitution. *Dtsch. Zahnärztl. Z.* 39, 970, (1984).
66. Pauwels, F.: Eine neue Theorie über den Einfluß mechanischer Reize auf die Differenzierung der Stützgewebe. *Entwicklungsgesch.* 121, 478, (1960).
67. Petri, W.H., Schaberg, S.J.: The Effects of Antibiotic Supplemented Bone Allografts on Contaminated partially Avulsive Fractures of the Canine Ulna. *J. oral Maxillofac. Surg.* 42, 699, (1984).
68. Pfirrmann R.W.: Taurolin. Ein neues Konzept zur antimikrobiellen Chemotherapie chirurgischer Infektionen. Hrsg. von Brückner, W.L., Pfirrmann, R.W., Urban u. Schwarzenberg, S. 3.
69. Rahn, B.A., Perren, S.M.: Calcein Blue as a fluorescent label in bone. *Experientia* 26, 519, (1970).
70. Rahn, B.A., Perren, S.M.: Xylenol - Orange, flouochrome usefull in polychrome sequential labeling of calcifying tissues. *Stain technol.* 16, 125 - 129, (1971).
71. Rahn, B.A., Perren, S.M.: Alizarinkomplexon - Fluorochrom zur Markierung von Knochen - und Dentinanbau. *Experientia* 28, 180, (1971).
72. Randzio, J., Thoma, K., Alex, R., Rhomberg, B.: Einheilung und Pharmakokinetik einer β - Trikalziumphosphat - Gentamicin - Kombination im Tierversuch. *Dtsch. Zahnärztl. Z.* 40, 668, (1985).

73. Redl, H., Schlag, G., Stanek, G., Hirschl, A., Seelich, T.: In vitro properties of mixtures of fibrin seal and antibiotics. *Biomaterials*, 29 - 32, (1983).
74. Redja, B.V., Peelen, J.G.J., K. de Groot: Tricalciumphosphate as a bone substitute. *Bioengin.* 1, 93, (1976).
75. Riess, G., Heide, H., Köster, K., Reiner, R.: Erste klinische und tier-experimentelle Erfahrungen mit Tricalciumphosphat (TCP) - Implantaten. *Dtsch. Zahnärztl. Z.* 33, 287, (1978).
76. Riess, G.: Klinische Erfahrungen mit Tricalciumphosphat (TCP) - Implan-taten. *Quintessenz der zahnärztlichen Literatur*, Quintessenz 29, 15, (1978).
77. Riess, G.: Prinzipien des TCP-Implantationssystems nach zweijähriger klinischer Erfahrung. *Dtsch. Zahnärztl. Z.* 8, 777, (1980).
78. Riff, J.L., Jakson, G.G.: *Pharmakology of Gentamicin in Man*. Dis. 124, Suppl. 98, (1971).
- burg, 79. Romeis, B.: *Mikroskopische Technik*. R. Oldenb., München, Wien, (1968).
80. Rosenbauer, K.A., Kegel, B.H.: *Rasterelektronenmikroskopische Technik*. Thieme, G., Stuttgart, (1978).
81. Schenk, R.: Die Histologie der primären Knochenheilung im Lichte neuer Konzeptionen über den Knochenumbau. *Unfallheilkunde* 81, 219, (1978).
82. Schenk, R., Willenegger, H.: Zur Histologie der primären Knochenheilung. *Langenbecks Arch. klin. Chir.* 308, 440 - 452, (1964).
83. Schulte, J., Burri, C.: *Behandlungsergebnisse mit PMMA - Ketten in Ulm*. Lokale Behandlung chir. Infektionen. Hrsg. Burri, C., Rüter, A., Huber, Bern, Stuttgart, Wien, 158, (1979).
84. Schultheis, K.H., Rehm, K.E., Völkel, W., Schiefer, H.G., Schulz, A., Kahl, M.: Der Prolamin-Antibiotikumverbund zur lokalen Therapie der Staph. aureus - bedingten Osteomyelitis. Ein neues Behandlungsverfahren. *Hefte Unfallheilk.*, Hrsg. Burri, Heim, Poigenfürst. Forumband der 4. Deutsch - österreichisch - schweizerischen Unfalltagung Lausanne, 8. - 11. Juni 1983, Springer, Berlin, Heidelberg, New York, Tokio.

85. Schultheis, K.H., Rehm, K.E., Deeg, C., Völkel, W., Schulz, A., Schiefer, G.: Resorbierbare Prolaminlösung, eine alternative Antibiotikaträgersubstanz. Hefte Unfallheilk., Hrsg. Burri, Heim, Poigenfürst. Forumband der 4. Deutsch – österreichisch – schweizerischen Unfalltagung Lausane, 8. – 11. Juni 1983, Springer, Berlin, Heidelberg, New York, Tokio.
86. Schultheis, K.H., Schiefer, H.G., Rehm, K., Kath, T., Schulz, A.: Die Behandlung von Knochen – und Weichteilinfektionen mit einer neuen resorbierbaren Antibiotikaträgersubstanz. Hefte Unfallheilk., Hrsg. Burri, Heim, Poigenfürst. Forumband der 4. Deutsch – österreichisch – schweizerischen Unfalltagung Lausane, 8. – 11. Juni 1983, Springer, Berlin, Heidelberg, New York, Tokio.
87. Simmons, D.J.: Fracture healing. Fundamental and clinical bone physiology. J.B. Lippincott company, Philadelphia Toronto, (1972).
88. Sternberger, A., Ascherl, R., Erhard, W., Haller, W., Machka, K., Blümel, G.: Experimentelle Untersuchungen zur Behandlung von Osteomyelitiden mit resorbierbaren biologischen, antibiotikagetränkten Arzneistoffträgern. Chir. For. 1983 f. exp. u. klin. Forschung. Hrsg. H. N. Schreiber, Springer, Berlin, Heidelberg, 141 – 143, (1983).
89. Strub, J. R., Gaberthüel, T. W.: Trikalziumphosphat und dessen biologisch abbaubare Keramik in der parodontalen Knochenchirurgie. Eine Literaturübersicht. Schweiz. Mschr. Zahnkd. 88, 789 – 803, (1978).
90. Thies, C.: Biodegradable Polymers for parenteral administration. Int. J. Pharm. Tech. and Prod. Mfr. 2, 25 – 32, (1981).
91. Thoma, K., Alex, R., persönl. Mitteilung, (1985).
92. Triffitt, J. T.: The organic matrix of bone tissue. Fundamental and clinical bone physiology. J. B. Lippincott company, Philadelphia, Toronto, (1972).
93. Uchida, A., Nade, M. L., McCartney, E. R., Ching, W.: The use of ceramics for bone replacement. A Comparative study of three different porous ceramics. J. bone joint surg. 66 – B, 269 – 275, (1984).
94. Wagner, W., Tetsch, P., Ackermann K. L., Böhmer, U., Dahl, H.: Tierexperimentelle Untersuchungen zur Knochenregeneration genormter Defekte nach der Implantation einer Trikalziumphosphatkeramik. Dtsch. zahnärztl. Z. 36, 82 – 85, (1981).

95. Wagner, W., Wahlmann, U. W.: Vergleichende tierexperimentelle Untersuchungen zur Knochen-Regeneration nach der Implantation verschiedener Kalziumphosphatkeramiken. Dtsch. zahnärztl. Z. 40, 664 - 667, (1985).
96. Wahlig, H., Schlep, J., Bergmann, R., Hameister, W., Grieben, A.: Über die Freisetzung von Gentamicin aus Polymethylmethacrylat. Langenbecks Arch. Chir. 331, 193 - 212, (1972).
97. Walter, C., Mang, W.: Künstlicher Knochen (Trikalziumphosphat) in der Gesichtschirurgie. Laryng. Rhinol. Otol. 61, 354 - 360, (1982).
98. Wesselowsky, U.: Med. Inaug. Diss., München, (1986).
99. Wolff, J.: Das Gesetz der Transformation der inneren Architektur der Knochen bei pathologischen Veränderungen der äusseren Knochenform. Histo-Morphologie des Bewegungsapparates 1. Grundlagen zur Morphologie und Funktion der Hüfte. Hrsg. K. Draenert, A. Rütt. Art and Science, München, (1981).

LEBENS LAUF

- 17.03.54 Geboren in Artopoula – Ioannina (Griechenland)
als Tochter griechischer Eltern.
Vater: Eftimios Papadopoulos
Mutter: Alexandra Papadopoulou, geb. Tselikou
- 1960 – 1966 Besuch der Volksschule in Artopoula – Ioannina
- 1966 – 1972 Besuch des Gymnasiums in Athen.
- 1973 – 1979 Studium der Zahnmedizin in Athen.
- 1979 Abschlußdiplom
- 1979 – 1981 Arbeit als Assistentin beim Kieferchirurgen Dr. Guy
Briche in Athen.
- 1982 Eigene Praxis in Athen.
- 1983 Erlernen der deutschen Sprache
- Mitte 1984 – Mitte 1985 Assistentin bei Zahnarzt Dr. Giannos in München
- Febr. 1984 – Mitte 1986 Dissertation bei Prof. Dr. Dr. Schlegel

